



TITLE:

# 免疫抑制剤タクロリムスの初回通過効果における小腸の役割に関する研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

下村, 昌寛

---

CITATION:

下村, 昌寛. 免疫抑制剤タクロリムスの初回通過効果における小腸の役割に関する研究. 京都大学, 2003, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2003-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k10141>

RIGHT:

免疫抑制剤タクロリムスの初回通過効果における  
小腸の役割に関する研究

2003

下 村 昌 寛

免疫抑制剤タクロリムスの初回通過効果における  
小腸の役割に関する研究

2003

下 村 昌 寛

# 目 次

## 総 論 の 部

緒 言	1
第Ⅰ章 タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の役割	4
第1節 タクロリムスの体内動態解析	4
第2節 摘出反転腸管法を用いたタクロリムスの代謝	6
第3節 ラット小腸における CYP3A 活性評価	7
第4節 考 察	10
第Ⅱ章 小腸部位差に着目したタクロリムス初回通過効果の比較解析	13
第1節 小腸におけるタクロリムス代謝における部位差の解析	13
第2節 空腸及び回腸切除ラットにおけるタクロリムス体内動態変動	15
第3節 考 察	19
第Ⅲ章 部分肝切除ラットにおけるタクロリムスの初回通過効果	23
第1節 部分肝切除ラットにおけるタクロリムス体内動態変動	24
第2節 部分肝切除後の肝 CYP3A 活性の評価	29
第3節 考 察	30
結 論	37
謝 辞	40

実 験 の 部 . . . . .	41
論 文 目 録 . . . . .	49
引 用 文 献 . . . . .	50

## 総 論 の 部

### 緒 言

タクロリムスは、1984 年茨城県筑波山近郊の土壤に生息する *Streptomyces tsukubaensis* の培養液中から単離された 23 員環のマクロライド系抗生物質であるが、抗菌活性はほとんど有しない (Fig. 1) <sup>1-6)</sup>。しかしながら、ヒト及びマウスにおいては T 細胞の活性化を阻害することで免疫抑制作用を示すことが見出された。タクロリムスは、肝臓、腎臓、心臓及び小腸移植時の拒絶反応抑制や、骨髄移植後の拒絶反応及び移植片対宿主病抑制を目的に使用されている <sup>1-4)</sup>。近年、全身型重症筋無力症や塗布剤としてアトピー性皮膚炎にも適応が追加され、さらに多くの疾患への適応拡大が期待される薬物である <sup>6, 7)</sup>。

タクロリムスはシクロスポリン A とは構造上大きく異なっているにもかかわらず、免疫抑制活性を発現する上での分子的作用機序は類似している。T 細胞の活性化にはヘルパー T 細胞 (Th-1) の産生する Interlukin-2 (IL-2) が必須であり、両薬物は Th-1 細胞の IL-2 産生を選択的に阻害することによって免疫反応を抑制する <sup>2, 5, 6)</sup>。即ち、タクロリムス及びシクロスポリン A はイムノフィリンと呼ばれる細胞質内に存在するレセプターと結合することによって薬理活性を示す。タクロリムスはイムノフィリン FK Binding Protein (FKBP12) と結合し、活性体であるタクロリムス-FKBP 複合体を形成する。この複合体は Th-1 細胞において、カルシニューリンによる Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) の脱リン酸化を阻害し、NFAT の核内への移行とそれに基づく

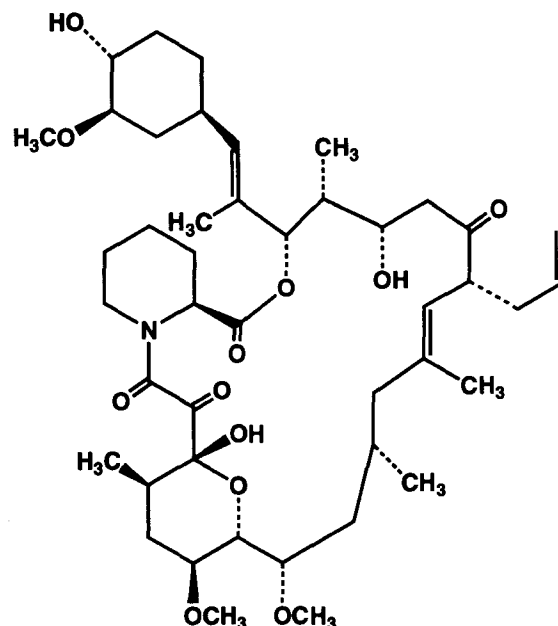
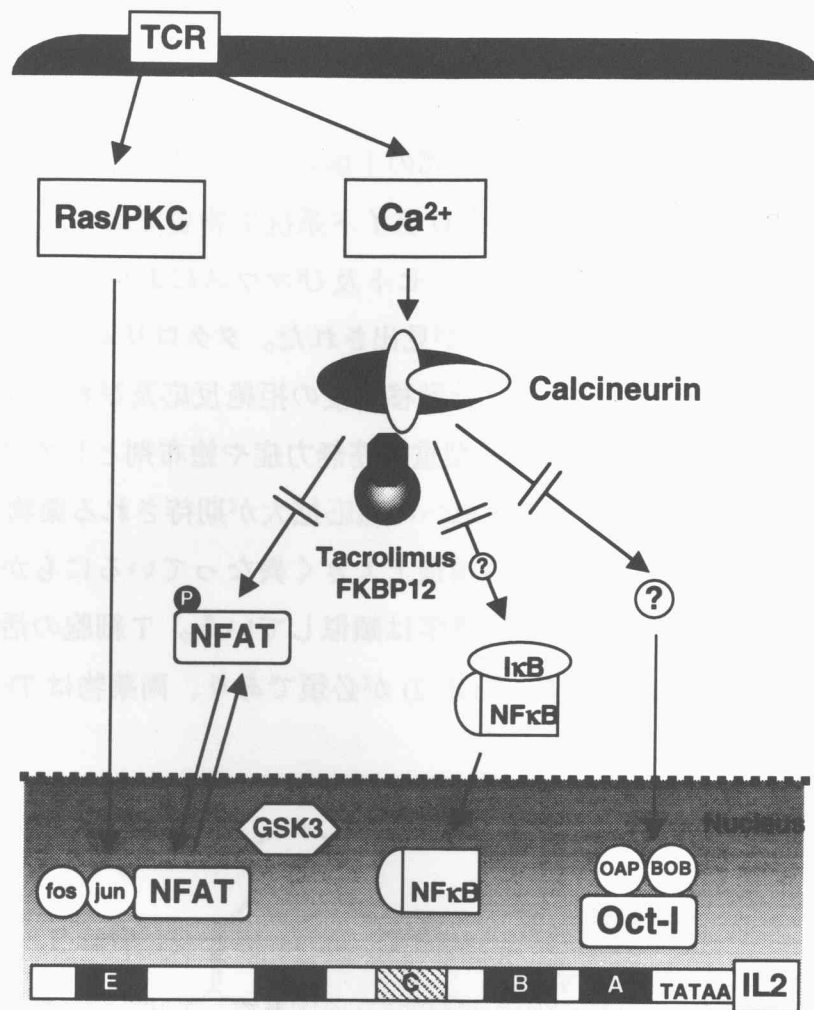


Fig. 1 Chemical structure of tacrolimus.



**Fig. 2 Effect of tacrolimus on IL-2 gene transcription during T cell activation <sup>5)</sup>.**

Engagement of the T cell receptor initiates at least two separate signaling pathways driven by Ras/PKC and an elevation of intracellular  $Ca^{2+}$ . The latter activates CaN. Enzymatically active CaN can dephosphorylate the cytoplasmic NFAT family members and cause the dissociation of inhibitor I $\kappa$ B from NF $\kappa$ B. NFAT and NF $\kappa$ B are then translocated into the nucleus where they can interact with their DNA binding sequences (A-E) on the IL-2 promoter. The complex formed between FKBP-12 and tacrolimus impedes access of CaN to its substrates and thereby, prevents the nuclear translocation or activation of these factors.

IL-2 mRNA の転写を阻害する (Fig. 2)。さらにタクロリムスは、IL-3、Interferon (IFN)  $\gamma$ 、Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$  といった T 細胞由来のサイトカイン産生も抑制し、その作用はシクロスポリン A より 10 ～100 倍強力である<sup>5)</sup>。

タクロリムスの有効血中濃度域は狭く、肝移植時には 10～20 ng/mL に設定されている<sup>8, 9)</sup>。臓器移植後の拒絶反応抑制薬として用いられる場合、血中濃度が有効域を下回ると拒絶反応が起きる。一方、血中濃度が上昇した時には、過度の免疫抑制による感染症、急性腎障害、中枢神経系障害、高カリウム血症及び高血糖等の副作用が起きることが報告されている<sup>1, 2, 5, 6)</sup>。また、タクロリムスの体内動態、特に経口投与時におけるバイオアベイラビリティの個体間変動が 4～89% と大きい<sup>1)</sup>ため、現段階では頻回の薬物血中濃度測定 (TDM) に基づく投与設計に頼らざるを得ない<sup>1)</sup>。これまで、タクロリムスは主に肝臓のチトクローム P450 (CYP) 3A によって代謝され体内から消失すると考えられていた<sup>1, 2, 6, 10-12)</sup>。一方、CYP3A は肝臓のみならず小腸上皮細胞にも発現すること<sup>13-15)</sup>、いくつかの薬物について小腸での代謝が体内動態に対して強く影響することが示されつつある<sup>16-21)</sup>。従って、タクロリムス体内動態の大きな個体間変動は、肝臓だけでなく小腸を含めた初回通過効果における個体間変動に起因することが想定される。しかし、タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の役割については不明の点が多い。

そこで著者は、タクロリムスの初回通過効果における小腸と肝臓の薬物動態学的な役割を明確にすることを目的として、ラット *in vivo* を用いた詳細な速度論的解析を行った。第 I 章では、タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の役割について正常ラットを用いて検討した。第 II 章ではタクロリムスの初回通過効果における小腸部位差に関する比較解析、さらに第 III 章において部分肝切除後の肝再生期におけるタクロリムスの肝臓及び小腸初回通過効果に対する寄与について解析を行った。

以下、本研究より得られた結果を論述する。



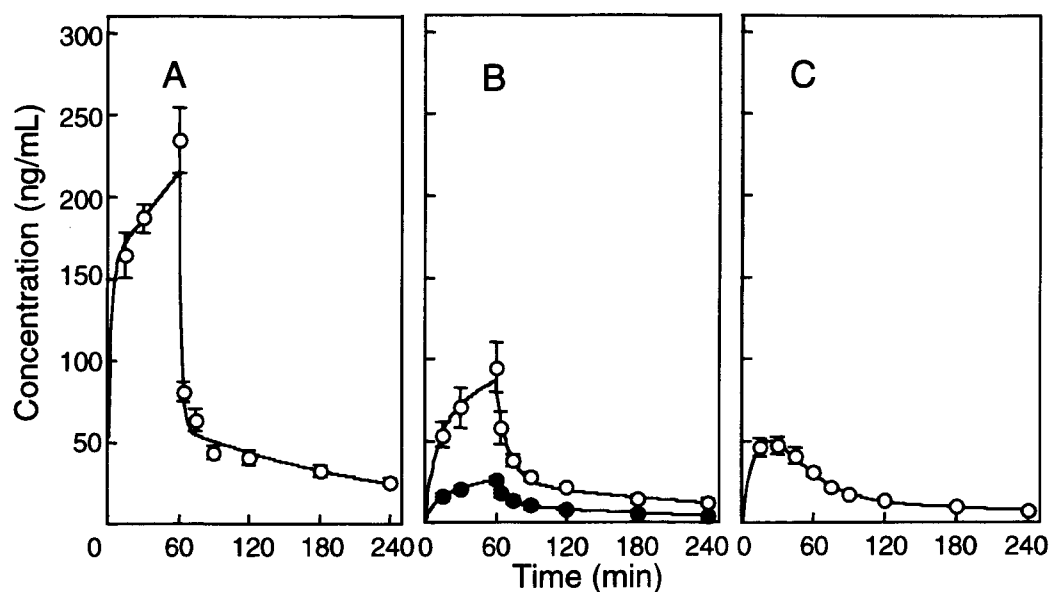
## 第I章 タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の役割

タクロリムスは強力な免疫抑制能を有するマクロライド系の化合物であり、臓器移植後の拒絶反応抑制などを目的に使用されている<sup>1-4)</sup>。本薬物は、シクロスポリン A と同様にカルシニューリン阻害効果を発揮し免疫抑制作用を示すが、シクロスポリン A よりも 10~100 倍強い薬理活性を持っている<sup>5)</sup>。しかし、有効血中濃度域が狭く、腎障害、神経障害等の重篤な副作用もシクロスポリン A より低い血中濃度で発現することが明らかになってきた<sup>1, 2, 5, 6)</sup>。さらに、体内動態の個体差、特に経口投与時におけるバイオアベイラビリティの個体間変動が大きいことが示唆されているため、本薬剤は投与設計の難しい薬物とされている<sup>1)</sup>。

タクロリムスは肝臓において CYP3A サブファミリーによって代謝され顕著な初回通過効果を受けることが示唆されているが、経口投与時のバイオアベイラビリティの変動機構については未だ不明の点が多い<sup>1, 8, 10-12)</sup>。一方、CYP3A サブファミリーは肝臓のみならず小腸上皮細胞にも発現していること<sup>13-15)</sup>、いくつかの薬物が小腸において CYP3A による代謝を受けることが示されつつある<sup>16-21)</sup>。さらに、CYP3A と類似の基質認識性を持つ薬物排出トランスポーター P-糖蛋白質 (Pgp) が小腸上皮細胞に発現し、いくつかの薬物のバイオアベイラビリティを低下させていることが示唆されつつある<sup>22, 23)</sup>。しかし、タクロリムスの小腸における初回通過効果については詳細な検討は行われていない。そこで本章では、タクロリムスの初回通過効果における肝臓及び小腸の寄与を明らかにするため、ラットを用いてタクロリムス体内動態の速度論的解析を行った。また、ラット摘出反転腸管法を用いて小腸におけるタクロリムスの代謝及び CYP3A 活性に関する検討を行った。

### 第1節 タクロリムスの体内動態解析

タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の寄与を明らかにするため、ラットに対してタクロリムスを静脈、門脈及び小腸管腔内に投与後 4 時間までの血中濃度推



**Fig. I-1 Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by HPLC-MEIA.** Tacrolimus was administered by 60-min intravenous (A), 60-min intraportal (B) infusion or intrainestinal (C) injection at a dose of 0.3 (closed symbols) or 1.0 (open symbols) mg/kg to normal rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of seven or eight rats.

**Table I-1 Pharmacokinetic parameters after intravenous infusion in normal rats**

Parameters	CL	$V_1$	Q	$V_{ss}$
	(mL/min/kg)	(L/kg)	(mL/min/kg)	(L/kg)
	$42.7 \pm 2.4$	$0.253 \pm 0.003$	$60.5 \pm 1.3$	$5.22 \pm 0.34$

Results are mean  $\pm$  S.E. of eight rats.

CL, Total clearance

$V_1$ , Volume of the central compartment

Q, Intercompartmental clearance

$V_{ss}$ , Volume of distribution

**Table I-2 Apparent clearance and bioavailability in normal rats**

Administration	Dose (mg/kg)	CL/F (mL/min/kg)	F (%)
Intraintestinal	1.0	163±18	26.2
Intraportal	1.0	107±13	39.8
Intraportal	0.3	104±20	41.3

Results are mean ± S.E. of seven or eight rats.

移を求めた (Fig. I-1)。門脈内投与時の血中濃度は、静脈内投与時と比べて大きく低下していた。また、小腸管腔内投与時の血中濃度は、門脈内投与時と比べてさらに低下していた。一方、タクロリムスの小腸からの吸収性は良好であり、小腸内投与4時間後、管腔内に残存していたタクロリムスは投与量の0.2%であった。Table I-1、I-2には各投与経路における体内動態パラメータを示した。静脈内投与時の血中濃度から算出したタクロリムスのクリアランス (CL) は 42.7 mL/min/kg であり、定常状態の分布容積 ( $V_{ss}$ ) は 5.22 L/kg であった。小腸管腔内投与時のバイオアベイラビリティ (F) は 26.2% と低く、門脈内投与時におけるバイオアベイラビリティは 1 mg/kg の投与量では 39.8%、0.3 mg/kg では 41.3% と算出され、この投与量の範囲ではタクロリムスの体内動態は線形であった。

## 第2節 摘出反転腸管法を用いたタクロリムスの代謝

前節では、小腸内投与時に小腸組織においてタクロリムスが消失することが示唆された。そこで、摘出反転腸管を用いて小腸におけるタクロリムスの代謝を解析した。タクロリムス溶液中で、ラット摘出反転腸管を1時間インキュベートした後に残存していたタクロリムス未変化体の量、及びその値から算出されるタクロリムス代謝量を Table I-3 に示した。インキュベート後にタクロリムスは粘膜側に 69.4%、小腸組織内に 7.6% 残存していたが、漿膜側は検出限界 (0.5%) 以下であり、摘出反転腸管をほとんど透過し

ないことが明らかになった。従って、1時間のインキュベート中にタクロリムスは約23%代謝されたと考えられた。一方、CYP3A 阻害剤であるミコナゾール共存下においては、粘膜側に85.4%、小腸組織内に15.3%のタクロリムスが残存しており、タクロリムスはほぼ100%回収された。従って、ミコナゾールによってタクロリムスの小腸組織における代謝は完全に阻害された、即ち小腸組織においてもタクロリムスはCYP3Aによって代謝されることが示唆された。

### 第3節 ラット小腸における CYP3A 活性評価

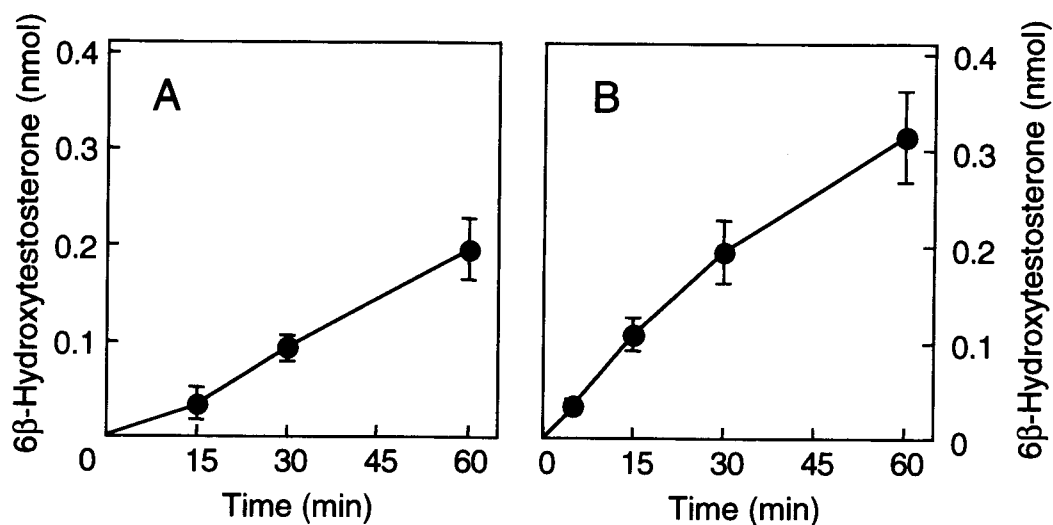
薬物吸収障壁としての小腸の機能を明らかにするため、タクロリムスと同様に CYP3A によって代謝されるテストステロンを用いて薬物代謝活性について解析を加えた。なお CYP3A 活性は、小腸及び肝臓ミクロソームを調製し、NADPH 生成系存在下テストステロン 6 $\beta$  水酸化活性を指標に測定した。ミクロソーム蛋白の収量は、肝臓で 15.7 mg/g tissue、小腸において 2.9 mg/g tissue であった。Fig. I-2 には肝臓及び、小腸ミクロソームにおけるテストステロン 6 $\beta$  水酸化体生成のタイムコースを示した。肝臓及び小腸のどちらにおいてもテストステロン 6 $\beta$  水酸化体生成は時間に対して直線的に増加した。小腸ミクロソームの実験で用いた蛋白量は肝臓ミクロソームの 100 倍であるにもかかわらず

**Table I-3 Amount remaining after incubation and metabolism of tacrolimus by the everted sac method**

	Miconazole (-)	Miconazole (+)
% of remained after 60 min		
Mucosal side	69.4 $\pm$ 2.7	85.4 $\pm$ 5.2 *
Tissue	7.6 $\pm$ 1.6	15.3 $\pm$ 1.6 *
% of metabolized	23.0 $\pm$ 2.5	-0.7 $\pm$ 6.1 *

Results are mean  $\pm$  S.E. of four separate experiments.

\*: Significantly different from respective value without miconazole, P<0.05.



**Fig. I-2 Time course of 6β-hydroxytestosterone formation by microsomes of rat small intestine (A) and liver (B).** Reaction mixtures containing 1 mg of small intestine microsomes protein or 0.01 mg of liver microsomes protein were incubated at 37°C with 200 μM testosterone. Each point represents the mean ± S.E. of three independent preparations of liver microsomes and six of small intestine microsomes.

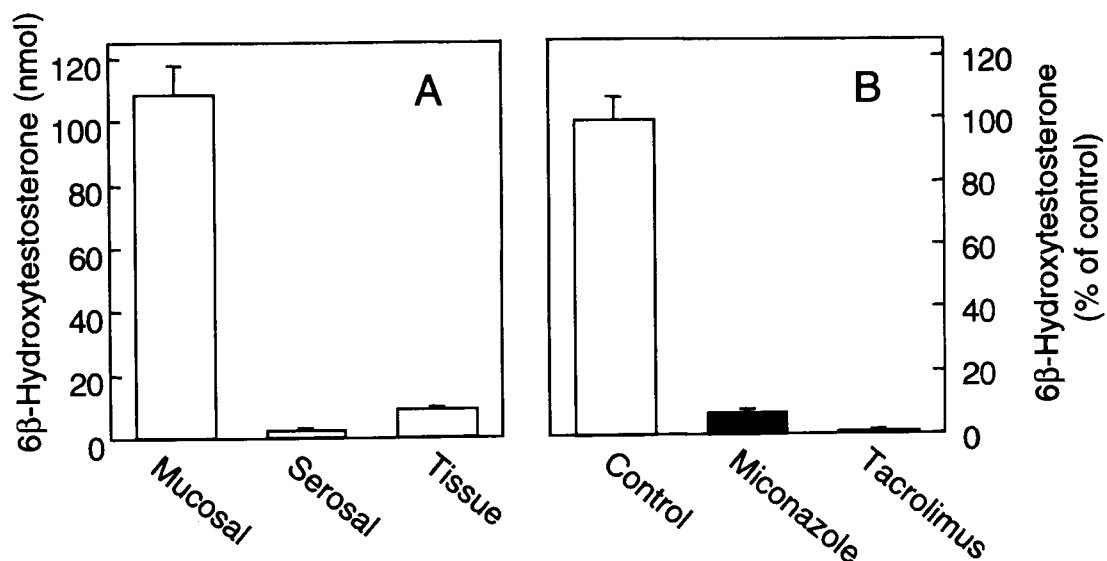
**Table I-4 Testosterone 6β-hydroxylase activity of microsomes and everted sacs**

Intrinsic Clearance	Microsomes		Everted Sacs
	Liver	Intestine	
(μL/min/g tissue)	51.0 ± 12.2 <sup>a</sup>	0.0318 ± 0.0052 <sup>b</sup>	5.48 ± 0.13 <sup>a</sup>
(μL/min/mg protein)	3.23 ± 0.54 <sup>a</sup>	0.0105 ± 0.0020 <sup>b</sup>	

Values are shown as means ± S.E. of three independent preparations of liver microsomes, six of small intestine microsomes and three independent everted sacs.

<sup>a</sup> Values were calculated from formation rate of 6β-hydroxytestosterone of 60 min.

<sup>b</sup> Values were calculated from formation rate of 6β-hydroxytestosterone of 30 min.



**Fig. I-3** 6β-Hydroxytestosterone formation by everted sacs of rat small intestine (A) and inhibitory effects of miconazole and tacrolimus on testosterone 6β-hydroxylation (B). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three independent everted sacs.

ずテストステロン 6β 水酸化活性は低く (Fig. I-2)、代謝活性を固有クリアランスで表すと肝臓では 51.0  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$  tissue、小腸では 0.0318  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$  tissue であった (Table I-4)。さらに、小腸組織における代謝活性を明らかにするため、摘出反転腸管を用いた代謝実験を行った。テストステロン溶液中で、ラット摘出反転腸管を 1 時間インキュベートした後生成した 6β 水酸化テストステロンの量を Fig. I-3 に示した。6β 水酸化テストステロンはほとんどが粘膜側及び小腸組織中に存在しており、漿膜側へはほとんど透過しなかった。また、摘出反転腸管における代謝活性を固有クリアランスで表すと 5.48  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$  tissue と算出された (Table I-4)。一方、摘出反転腸管におけるテストステロン 6β 水酸化活性は、CYP3A 阻害剤ミコナゾール及びタクロリムス共存下ではほぼ完全に阻害された (Fig. I-3)。

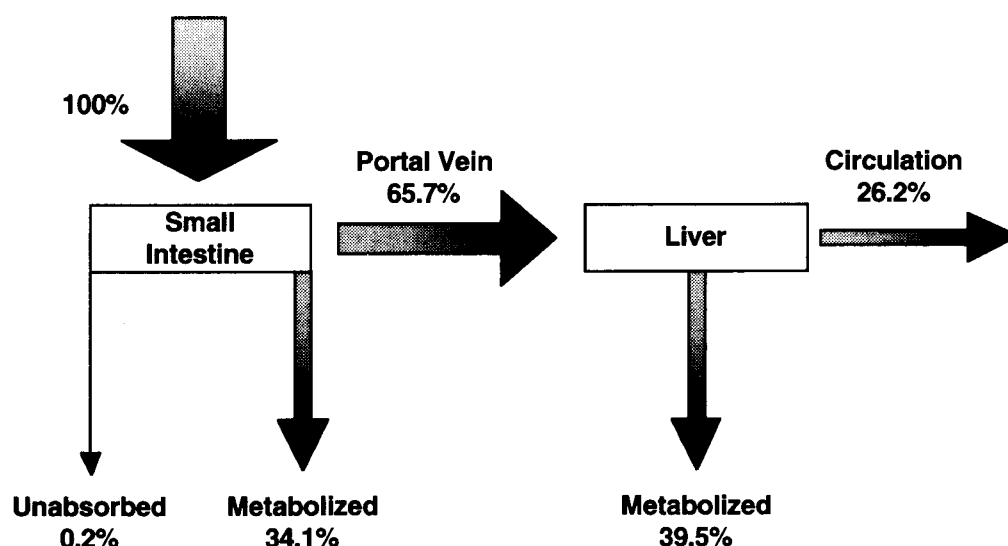
## 第4節 考 察

経口投与後のタクロリムスのバイオアベイラビリティは、腎、肝移植患者で4～89% (平均 25%) と低く、個体内・個体間変動も極めて大きい<sup>1)</sup>。近年、小腸に代謝酵素である CYP3A が発現することが報告されている<sup>13-15)</sup>。また、タクロリムスは CYP3A の基質であるため<sup>10-12)</sup>、肝臓での代謝に加えて小腸での代謝が、バイオアベイラビリティの低下や個体内・個体間変動に寄与していると推察される。さらに、タクロリムスを基質とする薬剤排出トランスポータ Pgp が、CYP3A と同様に小腸上皮細胞に発現していることが報告されている<sup>22, 23)</sup>。Pgp は CYP3A と類似の基質認識性を示すことが知られており、これら代謝酵素と薬剤排出トランスポータが協働的に機能し、小腸が薬物の初回通過効果に大きく関与しているという仮説が提示されている<sup>22)</sup>。従って、本章では吸収障壁としての小腸の機能に注目し、ラットを用いてタクロリムスの初回通過効果に関して速度論的解析を行い、バイオアベイラビリティに対する肝臓と小腸の寄与を明らかにした。また、摘出反転腸管法を用いてタクロリムスが小腸によって代謝されることを確認した。

第1節において、タクロリムスの小腸内投与4時間後には、小腸管腔内にタクロリムスはほとんど残存しないこと (投与量の 0.2%) が明らかとなった。またタクロリムスは pH 6.98 のバッファー中で24時間は安定であると報告されていることより<sup>24)</sup>、タクロリムスはほぼ完全に吸収されていたものと考えられた。さらに小腸内投与時の最高血中濃度到達時間が15-30分と短いことより、タクロリムスの吸収は速やかに行われるものと考えられた (Fig. I-1)。従って、タクロリムスをラット小腸内へ投与した場合の吸収は速く完全であり、吸収不全が小腸内投与時における低バイオアベイラビリティの要因ではないことが示された。

近年、ヒトにおいてシクロスポリン A 等の CYP3A の基質である薬物が、CYP3A 阻害剤によって小腸で代謝阻害を受け、薬物相互作用が起きる可能性が示唆されている<sup>16-23)</sup>。本研究においても、小腸内投与時のバイオアベイラビリティが26.2%と、門脈内投与時の値 (39.8%) に比べて低く、小腸でタクロリムスが代謝を受けていることが示唆された (Fig. I-1、Table I-2)。また、門脈内投与時のバイオアベイラビリティは投与量に依存し

なかったことから、タクロリムスの肝代謝は線形性を示す範囲であると考えられた。そこで、門脈内及び小腸内投与後のバイオアベイラビリティの値から、タクロリムスの肝臓及び小腸における抽出率を算出したところ、それぞれ 60.2%、34.2%であると推定された。即ち、小腸内に投与したタクロリムスを 100%とすると、0.2%が吸収されずに残存し、小腸組織によって 34.1%が代謝される。続いて、残りの 65.7%が門脈を通過して肝臓に入り、肝臓によって 39.5%が代謝され、最終的に 26.2%が全身循環に入るものと考えられた (Fig. I-4)。さらに、ラット摘出反転腸管法による検討で、タクロリムスの小腸での代謝が CYP3A の阻害剤であるミコナゾール共存により完全に阻害されたことから、小腸における 34.1%の消失は、CYP3A を介した代謝によるものであると考えられた。一方、組織内に残存したタクロリムスはミコナゾール共存下では 15.3%、非共存下では 7.6%であった。ミコナゾールは CYP3A だけでなく Pgp の阻害剤でもあるため、ミコナゾール共存下では組織中のタクロリムス濃度が上昇したものと推察された。従って、Pgp はタクロリムスを小腸管腔内へ排出することによって吸収不全ともたらずのではなく、小腸上皮細胞中のタクロリムス濃度を低く保つことによって、CYP3A の機能を補助している可能性が示唆された。



**Fig. I-4 Schematic diagram depicting the first-pass effect of tacrolimus after intestinal administration.**



CYP3A サブファミリーはラットにおいて 5 分子種 (CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23) がクローニングされており、そのうち CYP3A2, 3A9, 3A18, 3A23 の 4 分子種が雄性ラットの肝臓において発現していることが報告されている<sup>25-34)</sup>。しかし、小腸において発現している CYP3A 分子種については未だ不明である。また、ラットの各分子種に対する特異抗体も存在しないため、本章ではテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性を指標に CYP3A 活性として評価した<sup>33)</sup>。反転腸管におけるテストステロン 6 $\beta$  水酸化活性は、小腸ミクロソームの結果から予想される値に比べ約 170 倍と非常に高いものであり、反転腸管における代謝活性は肝臓ミクロソームの約 10 分の 1 に達することが示された (Table I-4)。従って、小腸ミクロソームの代謝活性を測定するだけでは小腸における初回通過効果を過小評価してしまう危険性があることが推察された。一方、Pgp は CYP3A と協働的に機能し、小腸が薬物の初回通過効果に大きく関与していると推察されているが<sup>22)</sup>、第 2 節における検討及び反転腸管における代謝活性が小腸ミクロソームより顕著に高いことより、Pgp と CYP3A が協働的に機能し高い代謝活性を示すことが示唆された。

以上より、タクロリムスの肝臓及び小腸における代謝が、タクロリムス経口投与時のバイオアベイラビリティが低く、個体間変動が大きい一因となっていることを明らかにした。さらに、小腸における CYP3A 活性は非常に高く、CYP3A を介した代謝によってタクロリムスと併用薬物や食物との相互作用が発生する可能性があると推測された。

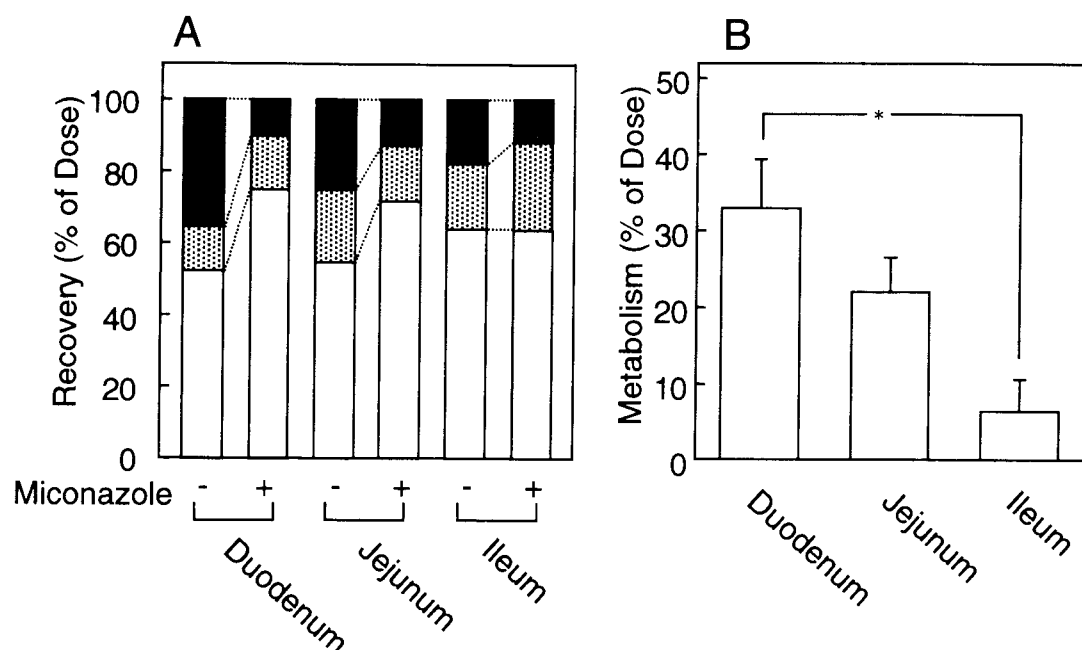
## 第Ⅱ章 小腸部位差に着目したタクロリムス初回通過効果の比較解析

生体に投与されたタクロリムスは、主として肝 CYP3A を介する代謝によって消失すると考えられていた<sup>1, 2, 6, 10)</sup>。しかし、第Ⅰ章においてタクロリムスは小腸において代謝され、初回通過効果を受けることを明らかにした。

小腸移植は短腸症候群の患者に対する根治的な治療法であり、タクロリムスによる免疫抑制療法は移植術後管理の中心的役割を果たす<sup>35, 36)</sup>。小腸移植において移植片として小腸全長を用いた場合、免疫的な負荷が大きく移植片対宿主病の危険性が増すため、部分小腸移植が推奨されている<sup>36)</sup>。特に、生体小腸移植では脂質吸収、臓器提供者の安全性を重視した術式の観点から回腸が移植片として用いられているが<sup>35, 36)</sup>、移植後は移植片がタクロリムスの吸収部位となるため、タクロリムスの吸収及び初回通過効果に及ぼす移植片の寄与は非常に大きいものと考えられる。しかしながら、タクロリムスの動態特性に着目した移植片小腸部位選択の妥当性に関する情報はほとんどない。そこで本章では、タクロリムスの初回通過効果に対する小腸の役割を機能的に明らかにすることを目的として、小腸各部位由来の摘出反転腸管を用いてタクロリムスの代謝実験を行った。さらに、空腸及び回腸切除ラットを用いてタクロリムスのバイオアベイラビリティの変化について検討を加えた。

### 第1節 小腸におけるタクロリムス代謝における部位差の解析

タクロリムスの代謝における小腸部位差を明らかにするため、ラット十二指腸、空腸、回腸由来の摘出反転腸管を用いて代謝実験を行った。何れの部位においても、1時間のインキュベーション後タクロリムスの未変化体はほとんど粘膜側及び組織中に存在しており、漿膜側にはほとんど透過しないことが明らかになった (Fig. II-1-A)。また、すべての部位においてミコナゾール共存下ではタクロリムスの代謝が阻害され、回収率が上昇していることが確認された。ミコナゾール非共存下の消失率から、共存下での消失率を差し引いた値は、摘出反転腸管によって代謝されたタクロリムスの割合を示すと考え



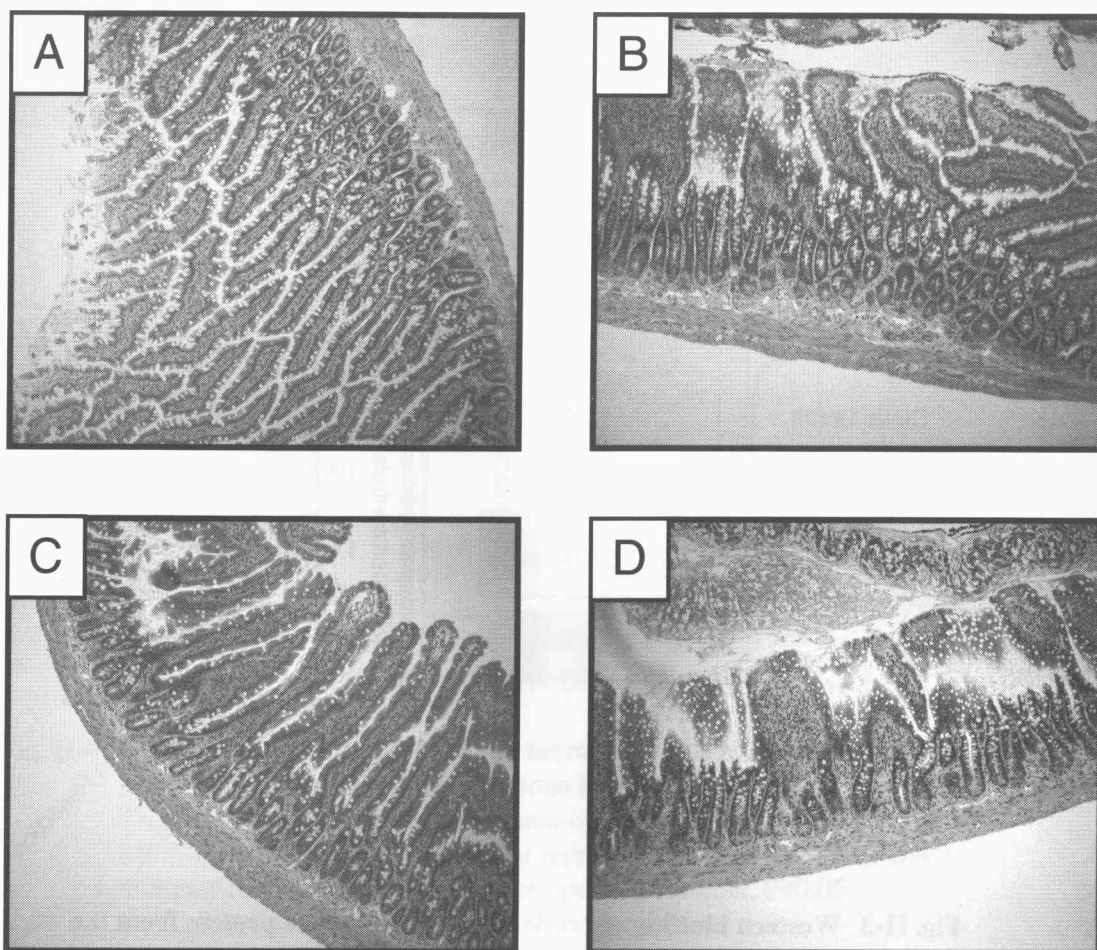
**Fig. II-1 Metabolism of tacrolimus in everted sac experiments.** A: Recovery rate of tacrolimus from the mucosal side (open columns) and tissue (dotted columns), and calculated elimination (closed columns) with or without miconazole. B: Metabolism of tacrolimus by everted sacs of the duodenum, jejunum and ileum calculated from the difference in recovery rate with and without miconazole. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats.  
\*: Significantly different from duodenum,  $P < 0.05$ .

**Table II-1 Body weight changes after small bowel resection surgery**

	POD* 0 (g)	POD 7 (g)	POD 7/POD 0 (%)
Sham operation	222 $\pm$ 9	243 $\pm$ 9	109 $\pm$ 3
Jejunum resection	225 $\pm$ 6	232 $\pm$ 9	103 $\pm$ 4
Ileum resection	221 $\pm$ 8	229 $\pm$ 12	104 $\pm$ 4

Results are means  $\pm$  S.E. of eight rats.

\*: POD, Post-operative day

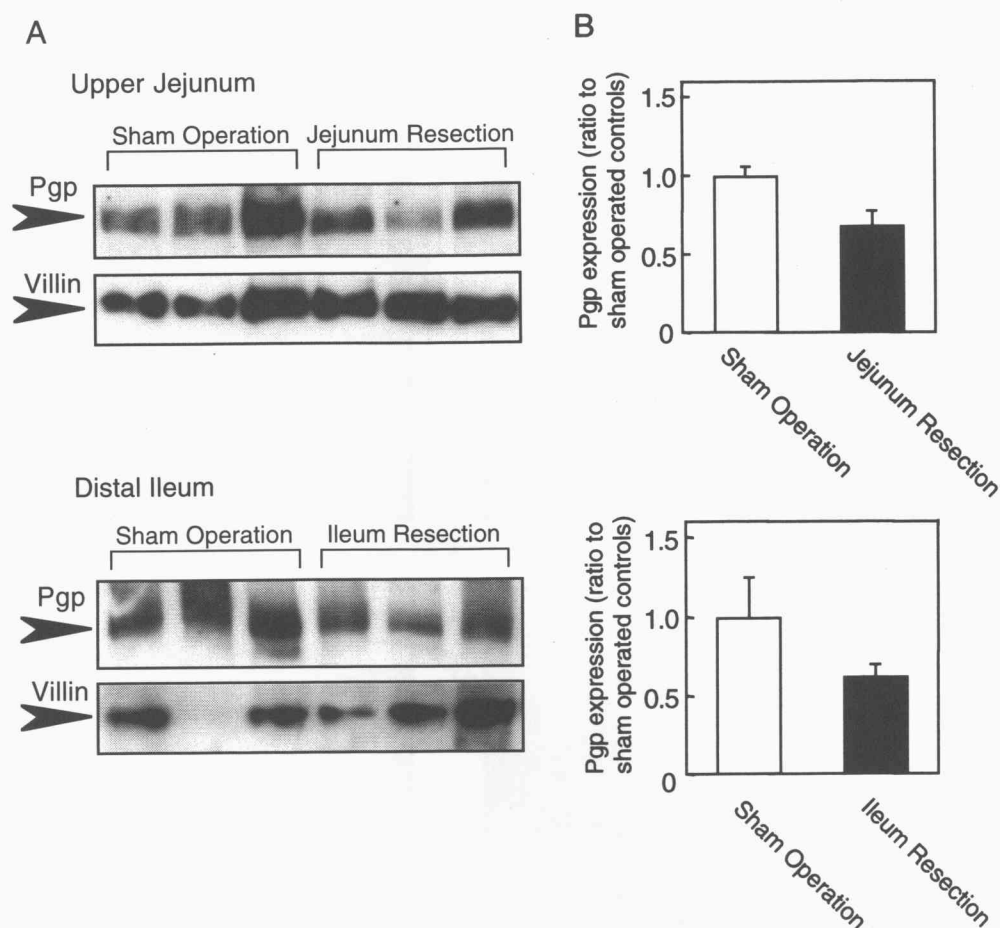


**Fig. II-2 Representative histological sections of small intestine.** Jejunum (A, C) and ileum (B, D) from before (A, B) and after ileum resection (C) or jejunum resection (D). Original magnification, x 200 (A, C) and x 400 (B, D).

られ、その数値は、十二指腸 33%、空腸 22%、回腸 6.4%であった (Fig. II-1-B)。以上の結果よりタクロリムスの代謝活性は、十二指腸がもっとも高く、空腸、回腸の順に代謝活性が低くなることが明らかになった。

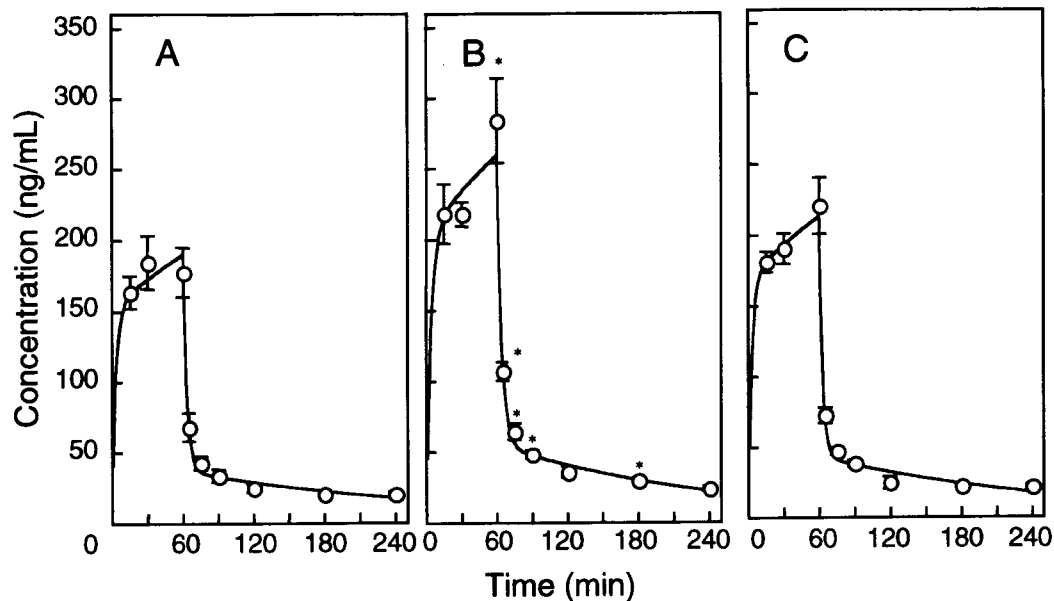
## 第2節 空腸及び回腸切除ラットにおけるタクロリムス体内動態変動

タクロリムスの初回通過効果における空腸及び回腸の寄与を明らかにするため、部分小腸切除ラットを作製した。空腸及び回腸切除ラットの体重増加は模擬処置ラットと比



**Fig. II-3 Western blotting of crude plasma membrane protein from the jejunum and ileum.** A: Crude plasma membrane protein (25  $\mu$ g) isolated from the upper jejunum and distal ileum was separated on SDS-PAGE. Pgp was identified using monoclonal antibody C219 and villin was identified using a polyclonal antibody to villin. B: Densitometric quantification of Pgp was performed with normalization of the results relative to the villin signals. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats.

較した場合、若干の低下が見られたが有意な差ではなかった (Table II-1)。また、空腸切除及び回腸切除ラット間では差が認められなかった。空腸及び回腸切除一週間後の小腸サンプルをパラフィン包埋した後ヘマトキシリン-エオシン染色し、顕微鏡下で観察したところ、形態的な変化は見られないことが示唆された (Fig. II-2)。さらに、空腸上部、回腸下部における Pgp の発現をウェスタンブロット法により検出し、発現量をバンド強度より定量化した結果、部分小腸切除後に Pgp 発現量は低下傾向を示したが、その差は有意なものではなかった (Fig. II-3)。以上より、部分小腸切除後一週間では残存小腸に



**Fig. II-4 Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by MEIA following 60-min intravenous infusion at a dose of 1.0 mg/kg.**  
Tacrolimus was administered to sham-operated (A), jejunum-resected (B) or ileum-resected rats (C). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of five rats.  
\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$

ほとんど変化はないことが確認された。以下の検討は小腸切除後一週間のラットを用いて行った。

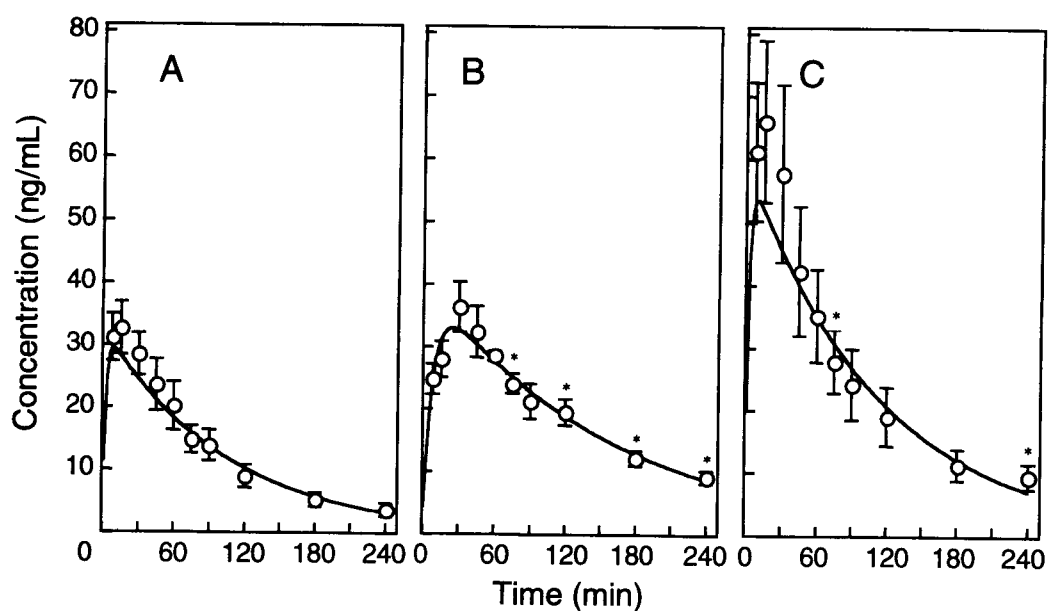
模擬処置、空腸及び回腸切除ラットに 1 mg/kg のタクロリムスを静脈内投与した後のタクロリムス血中濃度推移には大きな差はなかった (Fig. II-4)。静脈内投与後の血中濃度推移から求めた薬物動態パラメータは、空腸及び回腸切除ラットにおいて  $V_{ss}$  の低下がみられ、空腸切除ラットにおいて CL が低下することが明らかになった (Table II-2)。次に、タクロリムスの初回通過効果に対する小腸切除の影響を明らかにするため、模擬処置、空腸及び回腸切除ラットにタクロリムスを小腸内に瞬時投与した。何れの小腸切除ラットにおいても明らかなタクロリムスの血中濃度上昇が認められ、空腸切除ラットにおいて、模擬処置及び回腸切除ラットに比べ  $T_{max}$  が大きく遅延することが示唆された (Fig. II-5)。さらに、投与 4 時間後にはタクロリムスは小腸管腔内にほとんど残って

**Table II-2 Pharmacokinetic parameters after intravenous infusion of tacrolimus in sham-operated, jejunum-resected and ileum-resected rats**

Parameters	CL	V <sub>1</sub>	Q	V <sub>ss</sub>
	(mL/min/kg)	(mL/kg)	(mL/min/kg)	(L/kg)
Sham Operation	51.9 ± 3.0	349 ± 19	53.9 ± 3.7	6.65 ± 0.31
Jejunum Resection	40.5 ± 2.1*	324 ± 10	37.8 ± 1.8*	4.06 ± 0.24*
Ileum Resection	49.2 ± 1.5	280 ± 11*	46.1 ± 2.1	5.05 ± 0.13*

Results are mean ± S.E. of five rats.

\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$



**Fig. II-5 Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by MEIA following intrainstestinal injection at a dose of 1.0 mg/kg.**

Tacrolimus was administered to sham-operated (A), jejunum-resected (B) or ileum-resected rats (C). Each point represents the mean ± S.E. of five rats.

\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$

**Table II-3 Pharmacokinetic parameters after intrainestinal administration  
in sham-operated, jejunum-resected and ileum-resected rats**

Parameters	CL/F (mL/min/kg)	F (%)	T <sub>max</sub> (min)	C <sub>max</sub> /C <sub>min</sub>
Sham Operation	302 ± 41	17.2	9.3 ± 1.0	9.3 ± 2.5
Jejunum Resection	166 ± 9*	24.2	25.2 ± 0.9*	3.7 ± 0.3
Ileum Resection	151 ± 24*	32.5	10.1 ± 1.4	6.9 ± 1.5

Results are means ± S.E. of five rats.

\* Significant differences from sham operated controls, P < 0.05.

いなかったことから、小腸切除ラットにおいてもタクロリムスの小腸における吸収は極めて良好であることが確認された。小腸内投与時の血中濃度推移から T<sub>max</sub> を算出し、静脈、及び小腸内投与時の AUC から、小腸内投与時のバイオアベイラビリティを算出し Table II-3 に示した。空腸切除ラットにおいて T<sub>max</sub> は、模擬処置ラットに比べ約 2 倍に遅延していることが明らかになった。また、バイオアベイラビリティは回腸切除ラットにおいて、模擬処置ラットの約 2 倍に上昇しており、空腸切除ラットにおいても若干の上昇が認められた。さらに C<sub>max</sub>/C<sub>min</sub> 比を比較した結果、空腸切除ラットにおいて模擬処置ラットの約 40% に低下していた。

### 第3節 考 察

第 I 章における検討より、タクロリムスの肝臓及び小腸における代謝が、タクロリムス経口投与時のバイオアベイラビリティが低く、個体間変動が大きい一因であることが明らかとなった。生体部分小腸移植では術式の観点から回腸が移植片として選択されることが多いが<sup>35, 36)</sup>、タクロリムスの吸収・代謝を担う小腸の部位差に関する情報はほと

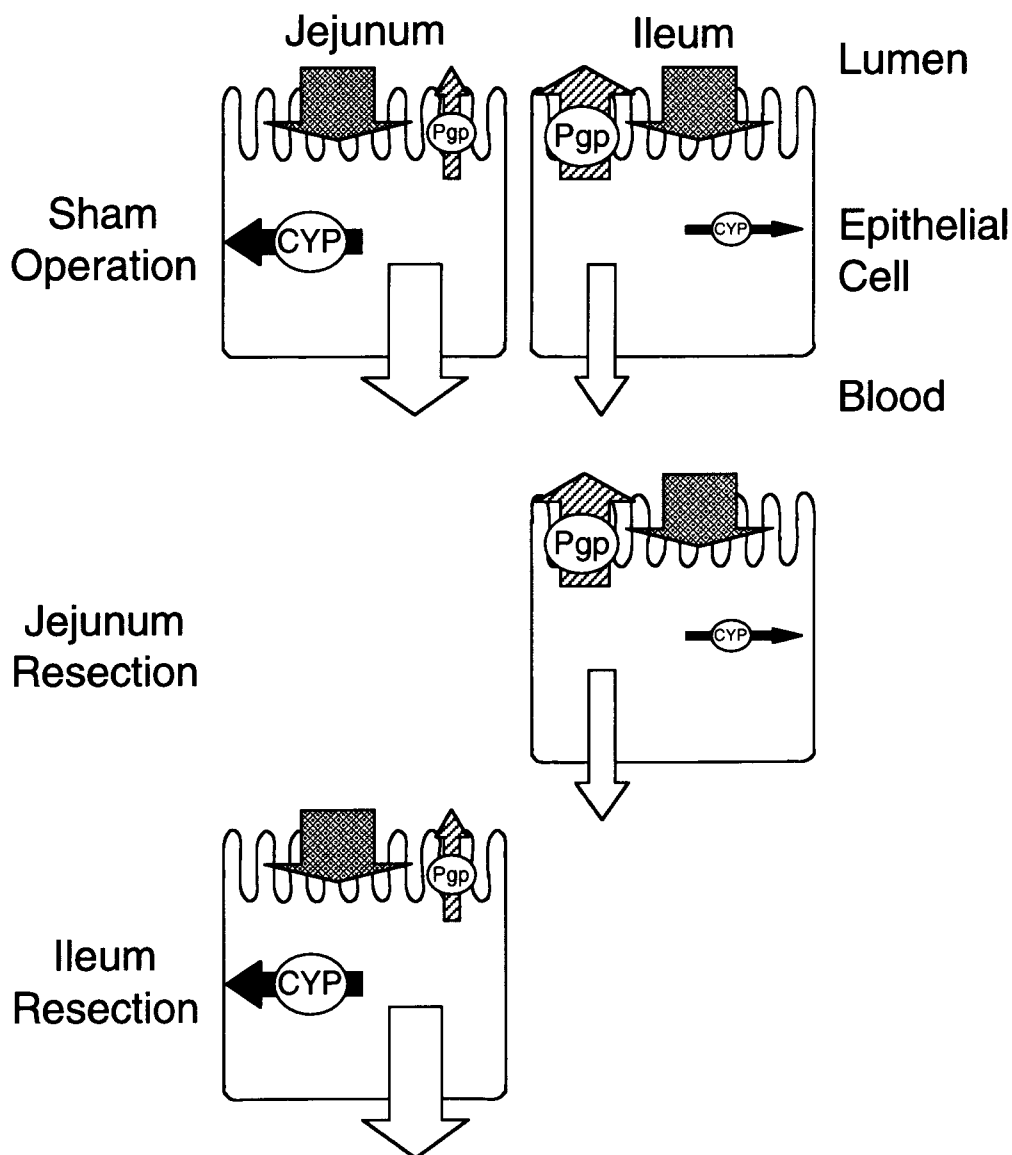


んど無い。従って、本章ではタクロリムスの初回通過効果に対する小腸部位差に注目し、摘出反転腸管法を用いてタクロリムス代謝活性を評価した。さらに、空腸及び回腸切除ラットを用い、タクロリムス初回通過効果における空腸及び回腸の寄与について比較解析を行った。

タクロリムスの代謝に関与する CYP3A 蛋白の発現量は、小腸上部における発現量が中部及び下部に比べ高いことが報告されている<sup>15, 22)</sup>。一方、タクロリムスを基質とする薬剤排出トランスポータ Pgp は、CYP3A とは反対に小腸上部から下部にかけて発現量が上昇することが報告されている<sup>22, 37)</sup>。第 1 節において摘出反転腸管におけるタクロリムス代謝活性は、十二指腸>空腸>回腸の順であり、CYP3A 発現量に対応したものであった (Fig. II-1)。

Masuda ら<sup>35)</sup> は生体小腸移植患者においてタクロリムス血中濃度/投与量比が Pgp をコードする Multidrug Resistance protein (MDR1) mRNA の小腸における発現量と良好な負の相関を示すことを報告した。従って、Pgp 発現量に変化が認められる場合、タクロリムスのバイオアベイラビリティに影響を与えることが推察される。しかし、第 2 節において用いた術後 7 日後の小腸部分切除ラットでは Pgp 発現量に変化が見られず、さらに形態学的な変化も見られなかった (Figs. II-2、II-3)。そのため、小腸部分切除後一週間では残存小腸における機能的な変化はなく、タクロリムス体内動態変動は空腸及び回腸の機能的欠損を反映することが示唆された。

空腸及び回腸切除ラットにおけるタクロリムスのバイオアベイラビリティ上昇は、タクロリムス吸収量の増大、もしくは小腸における初回通過効果の減少に起因することが推察される。しかしながら小腸内投与実験終了後、小腸管腔内に残存していたタクロリムスの投与量に対する割合は、模擬処置群 1.1%、空腸切除群 1.2%、回腸切除群 0.8%であり、吸収はほぼ完全であった。これらの結果より、部分小腸切除群におけるタクロリムスのバイオアベイラビリティ上昇は、小腸における初回通過効果の減少によるものであることが明らかになった。*In vivo* における小腸各部位のタクロリムス初回通過効果は CYP3A による代謝、Pgp による小腸管腔側へのくみ出し及び血流による洗い流しの過程の総和と考えられる<sup>22, 38)</sup>。摘出反転腸管及び *in vivo* における検討から、回腸における代謝活性は空腸よりも低いにもかかわらず、空腸及び回腸のどちらにおいてもタクロリ



**Fig. II-6** A schematic diagram depicting the process of first-pass extraction in the jejunum and ileum following an oral administration of tacrolimus. To gain entry into the body, tacrolimus absorbed from the gut lumen into epithelial cells (shaded arrow) is metabolized by CYP3A (closed arrow), and is also excreted by Pgp (hatched arrow), then remnant tacrolimus diffuses into the portal blood (open arrow). In the jejunum, the expression level of CYP3A is higher than that in the ileum and, the expression level of Pgp is lower than that in ileum. Therefore, the metabolic activity of tacrolimus in the jejunum is higher than that in the ileum, but the rate of diffusion into portal blood is fast. On the other hand, the high level of Pgp expression in the ileum limits the tacrolimus diffusion rate into the portal blood.

ムスは顕著な初回通過効果を受けることが明らかになった (Fig. II-5、Table II-3)。一方、吸収部位が回腸となる空腸切除ラットにおいて  $T_{max}$  が模擬処置及び回腸切除ラットの約二倍に延長した。これは、回腸の表面積が空腸に比べ小さいこと、及び Pgp 発現量が空腸に比べて顕著に高いことに起因すると考えられる<sup>37)</sup>。これらの結果から、空腸においては高い CYP3A 活性がタクロリムス初回通過効果に寄与していること、回腸においては高い Pgp 発現量がタクロリムス吸収を遅らせることにより、結果として CYP3A への暴露時間が長くなるため、*in vivo* において顕著な初回通過効果を示すことが推察された (Fig. II-6)。

本章で用いた部分小腸切除モデルは、簡便な部分小腸移植時の体内動態のモデルとしても用いることができると考えられる。空腸切除ラットにおいてタクロリムスの吸収遅延が認められることから、移植片として回腸を用いた生体小腸移植患者において、他の臓器移植患者に比べタクロリムスの  $T_{max}$  が延長する、即ち免疫抑制の標的臓器である小腸に長く残存することが予想される (Fig. II-5、Table II-3)。また、空腸切除ラットにおいてタクロリムスの  $C_{max}/C_{min}$  値が回腸切除ラットよりも小さいことから、回腸移植時にはタクロリムスのトラフ値を高く設定しても、 $C_{max}$  値は空腸移植時よりも低くコントロールできることが示唆された。これらの特徴から、回腸を移植片として用いた小腸部分移植は、臓器提供者の安全性を重視した術式の観点からだけでなく免疫抑制療法の観点からも優れていることが示された。一方、回腸切除ラットにおいてバイオアベイラビリティの上昇が見られたことから、回腸を用いた生体小腸移植の臓器提供者において CYP3A によって代謝される薬物を投与する際に血中濃度が上昇する可能性が示唆された。

以上より、空腸及び回腸はそれぞれ異なる機能的特徴を有しており、これらの総和がタクロリムスの初回通過効果として現れること、回腸を用いた生体部分小腸移植は術後管理の面からも空腸移植よりも優れていることが明らかになった。

### 第Ⅲ章 部分肝切除ラットにおけるタクロリムスの初回通過効果

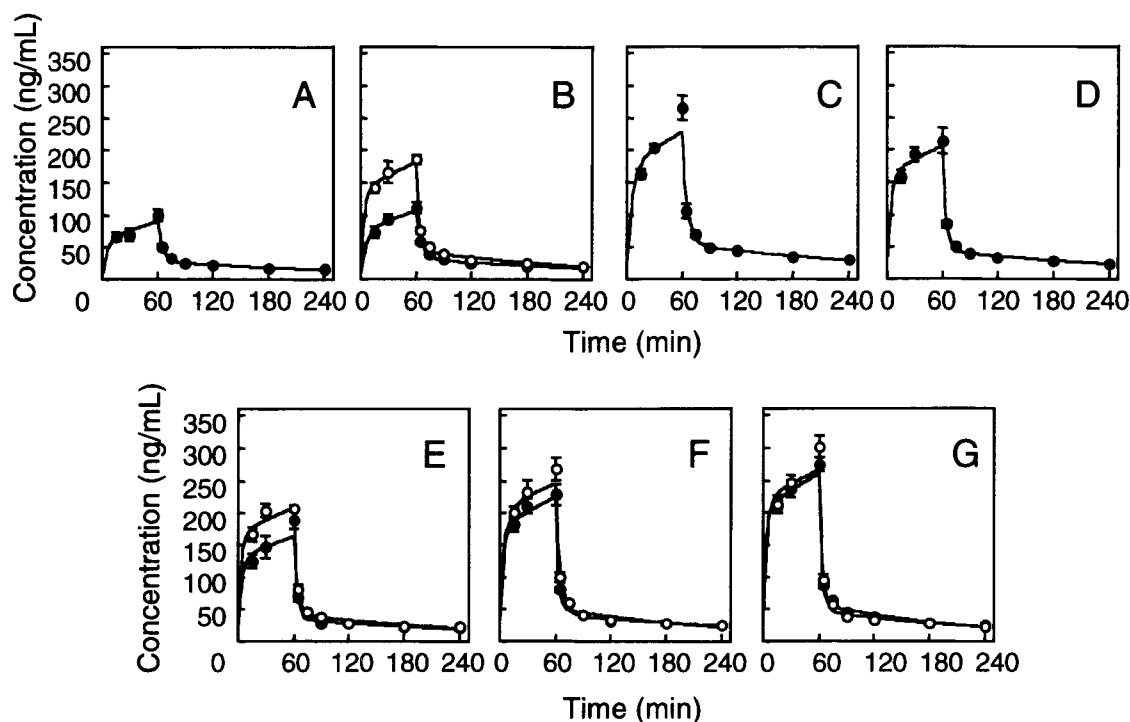
カルシニューリン阻害薬であるタクロリムスは、強い免疫抑制作用を持つマクロライド化合物であり、肝移植の術後管理に必須の薬物である<sup>1, 3, 4, 39, 40)</sup>。近年、臓器提供者から安全に肝臓の右葉を摘出できるようになり、生体部分肝移植が小児だけでなく成人に対しても適用されるようになった<sup>41-46)</sup>。生体部分肝移植直後はタクロリムスの体内動態が不安定であることが知られ、タクロリムスの初期投与量を決定するための情報が不足している<sup>8-10)</sup>。しかし、生体部分肝移植術後の移植肝は経日的に再生し増大することが知られ、タクロリムスをはじめ多くの薬物が肝臓において代謝・排泄を受けることから、肝再生期における薬物動態の変動を明らかにすることは、移植患者に対する薬物投与設計を立てる上で重要である。著者は第Ⅰ章において、タクロリムスは肝臓のみならず小腸においても顕著な初回通過効果を受けることを示した。また、Hashida ら<sup>47)</sup>は生体部分肝移植後の患者において、移植後 1 週間はタクロリムスの血中濃度/投与量比が小腸 MDR1 mRNA の発現量と負の相関を示すことを報告している。第Ⅰ、Ⅱ章及びこれらの検討からタクロリムス体内動態における大きな個体間変動は、小腸における初回通過効果の個体差に起因している可能性が示された。しかし、Hashida らの検討は移植後一週間に限ったものであるため、一週間以上経過した後については不明である。一方、Fukatsu ら<sup>48)</sup>はタクロリムス体内動態の母集団解析の結果、成人生体肝移植患者においてタクロリムスの全身クリアランスが経時的に増大することを明らかにした。このようなタクロリムス体内動態の変動は、肝組織重量の回復、代謝酵素などの発現変動に起因するものと想定されるが、詳細な機序については不明である。

そこで本章では、生体部分肝移植直後は肝臓における初回通過効果が小さいために、小腸での初回通過効果に大きく影響を受け、術後日数が経過するに従って肝臓の寄与が増大するという仮説を立て、それらを証明するため以下の検討を行った。

## 第1節 部分肝切除ラットにおけるタクロリムス体内動態変動

肝再生期におけるタクロリムス体内動態の変動について詳細に検討するため、70%部分肝切除モデルを作製した。肝切除後の肝重量は術後1日まで回復が見られず、2日以降は経時的に回復した。ALT、AST、総胆汁酸値などの肝機能マーカーは、術後一過性に上昇し、4日目には模擬処置群と同程度まで低下した (Table III-1)。

まず、タクロリムスの消失に及ぼす肝切除の影響を明らかにするため、肝重量によって投与量を調節し静脈内にタクロリムスを定速投与し、投与後4時間までの経時的な血中濃度推移を求めた (Fig. III-1)。肝切除群においてタクロリムスの消失が遅延している



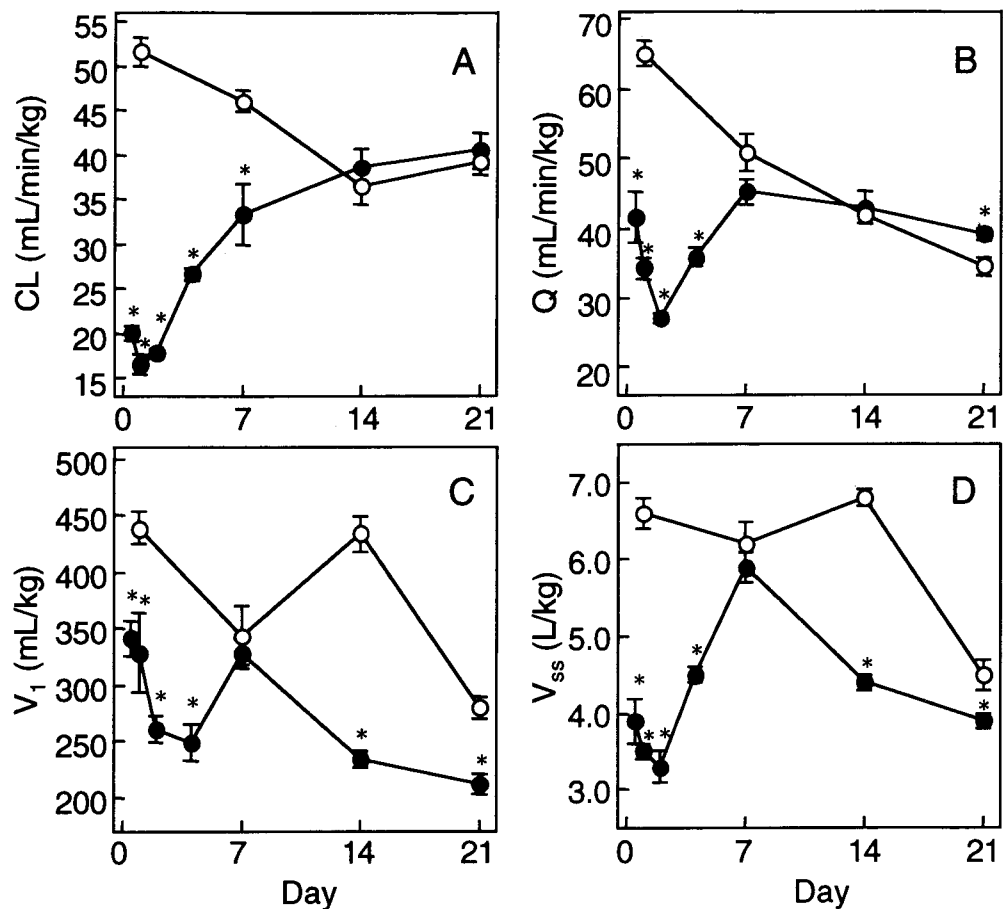
**Fig. III-1** Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by MEIA following 60-min intravenous infusion at a dose of 0.125 mg/g liver/kg. Tacrolimus was administered to rats at the different time points after partial hepatectomy (closed symbols) and at a dose of 1.0 mg/kg to sham operated rats (open symbols), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 7 (E), 14 (F) and 21 (G) day. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four to five rats.

**Table III-1 Changes in liver weight and biochemical parameters after partial hepatectomy**

Days after Hepatectomy	0.5	1	2	4	7	14	21
<b>Sham Operated Rats</b>							
Total Bile Acid ( $\mu\text{M}$ )		44.0 $\pm$ 8.3			72.9 $\pm$ 7.4*	41.3 $\pm$ 7.4	76.9 $\pm$ 12.9
ALT (I.U./L)		24.8 $\pm$ 1.9			27.4 $\pm$ 1.8	23.2 $\pm$ 1.2	25.5 $\pm$ 1.6
AST (I.U./L)		76.1 $\pm$ 3.6			82.9 $\pm$ 4.7	79.2 $\pm$ 4.2	73.0 $\pm$ 2.3
Liver Weight (g)		8.4 $\pm$ 0.9			8.8 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.5	10.6 $\pm$ 1.2
<b>Partial Hepatectomized Rats</b>							
Total Bile Acid ( $\mu\text{M}$ )	110 $\pm$ 20.7*	182.2 $\pm$ 18.4*	103.3 $\pm$ 18.4*	76.9 $\pm$ 12.9	39.6 $\pm$ 4.1	34.7 $\pm$ 4.6	47.6 $\pm$ 7.9
ALT (I.U./L)	529.0 $\pm$ 78.2*	158.2 $\pm$ 28.5*	122.2 $\pm$ 36.7*	33.0 $\pm$ 1.6*	18.6 $\pm$ 1.7	15.7 $\pm$ 1.0	24.8 $\pm$ 2.6
AST (I.U./L)	1486.5 $\pm$ 371.2*	478.7 $\pm$ 85.3*	321.4 $\pm$ 86.8*	105.3 $\pm$ 4.2*	64.3 $\pm$ 2.5	68.5 $\pm$ 3.8	80.1 $\pm$ 6.7
Liver Weight (g)	2.3 $\pm$ 0.3*	2.4 $\pm$ 0.3*	3.6 $\pm$ 0.7*	4.8 $\pm$ 0.5*	5.1 $\pm$ 0.4*	6.5 $\pm$ 0.6*	8.4 $\pm$ 2.0

Results are the mean  $\pm$  S.E. of five rats.

\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$



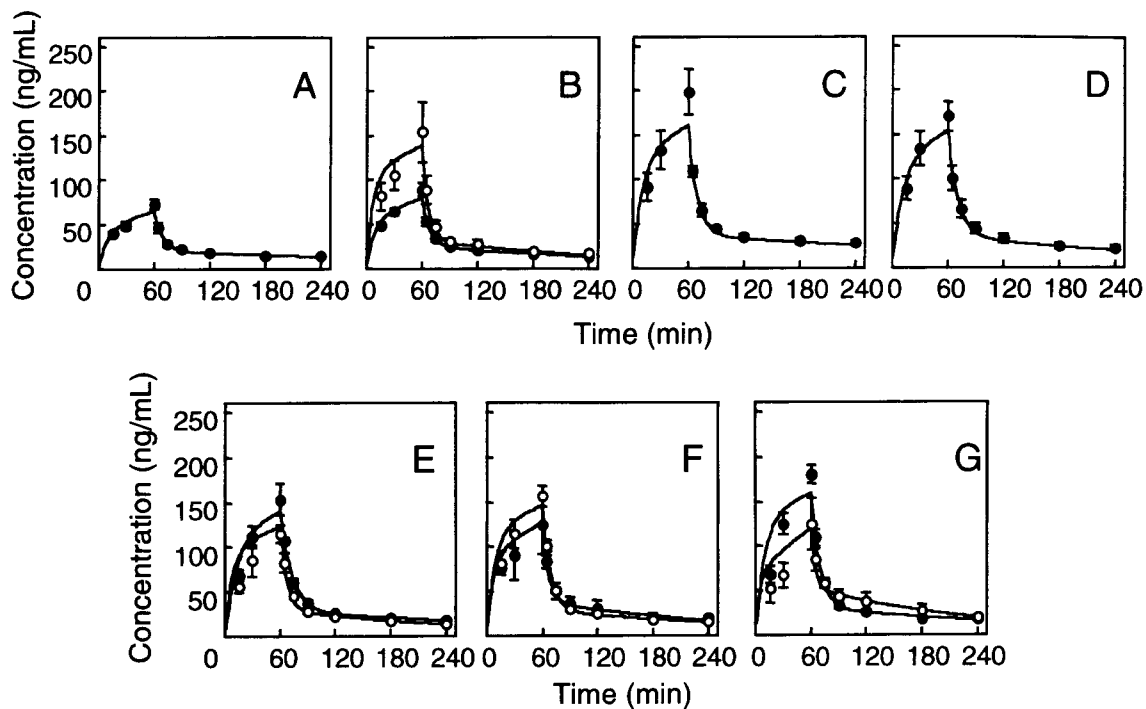
**Fig. III-2 Pharmacokinetic parameters after partial hepatectomy.** Changes in total clearance (A), intercompartmental clearance (B), the volume of the central compartment (C) and the volume of distribution (D) of tacrolimus in sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats.

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four to five rats.

\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$

ことが明らかになった。しかし、タクロリムスの消失は徐々に回復し、術後14日にはほぼ模擬処置群と同程度であることが示唆された。静脈内投与後の血中濃度推移よりタクロリムスの体内動態パラメータを算出し Fig. III-2 に示した。肝切除によって CL は約30%に低下し、経日的に回復した。Q、 $V_1$ 、 $V_{ss}$  も同様に肝切除によって低下した。

次に、タクロリムスの肝臓における初回通過効果に及ぼす肝切除の影響を検討するた

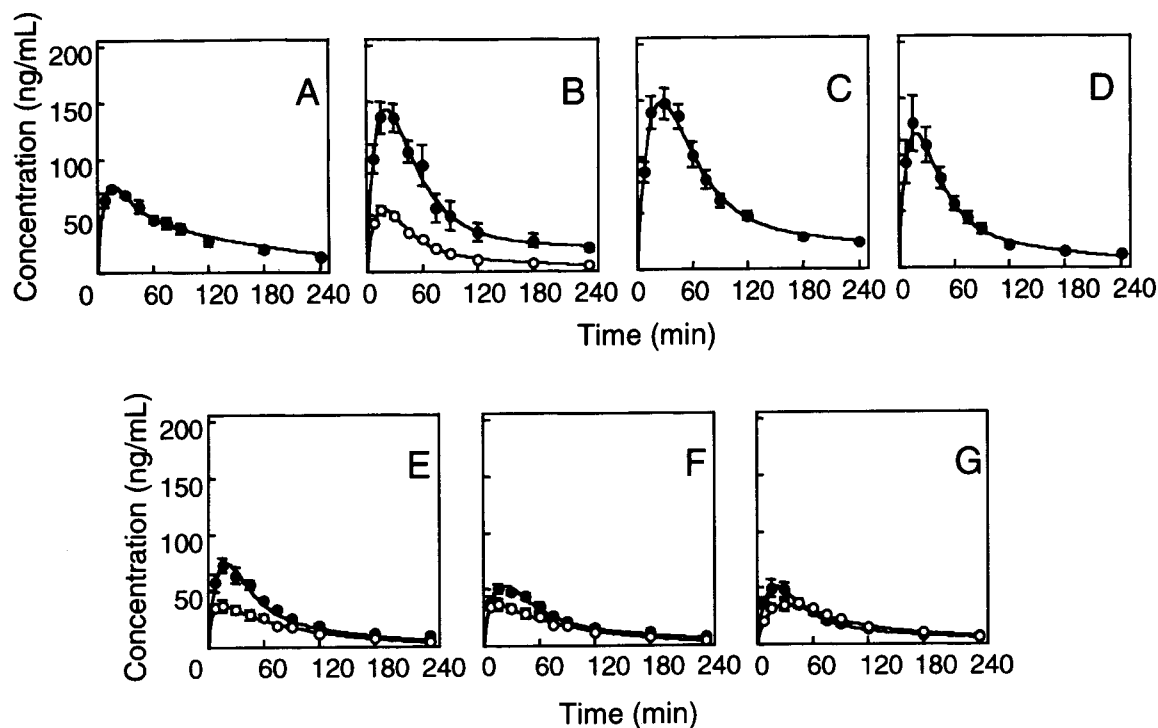


**Fig. III-3** Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by MEIA following 60-min intraportal infusion at a dose of 0.125 mg/g liver/kg. Tacrolimus was administered to rats at the different time points after partial hepatectomy (closed symbols) and at a dose of 1.0 mg/kg to sham operated rats (open symbols), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 7 (E), 14 (F) and 21 (G) day. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four to five rats.

め、肝重量によって投与量を調節し門脈内にタクロリムスを定速投与し、投与後4時間までの経時的な血中濃度推移を求めた (Fig. III-3)。門脈内投与後の血中濃度は、静脈内投与後の血中濃度よりも低下しており、部分肝切除ラットにおいてもタクロリムスは肝初回通過効果を受けることが明らかとなった。

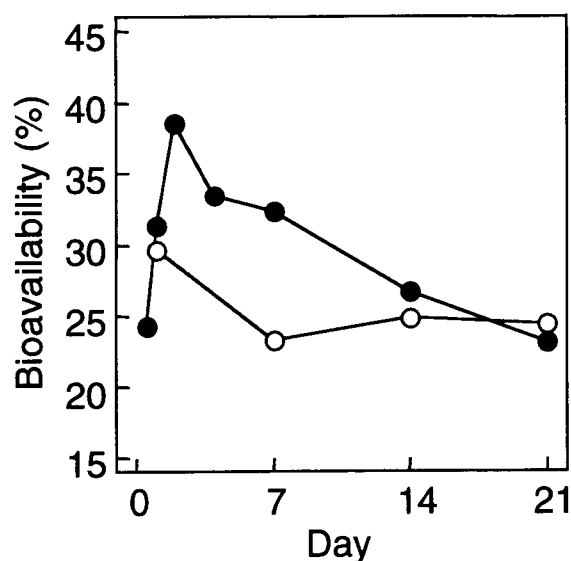
さらに、タクロリムスの小腸における初回通過効果に及ぼす肝切除の影響を検討するため、1 mg/kg のタクロリムスを小腸内に瞬時投与し、投与後4時間までの血中濃度推移を求めた (Fig. III-4)。肝切除群では、術後2日目まで顕著な血中濃度上昇が見られたが、4日目以降徐々に低下し、14日目までにほぼ模擬処置群程度まで低下した。また、





**Fig. III-4** Time course of changes in blood tacrolimus concentrations measured by MEIA following intrainstestinal injection at a dose of 1.0 mg/kg. Tacrolimus was administered to rats at the different time points after partial hepatectomy (closed symbols) and to sham operated rats (open symbols), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 7 (E), 14 (F) and 21 (G) day. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four to five rats.

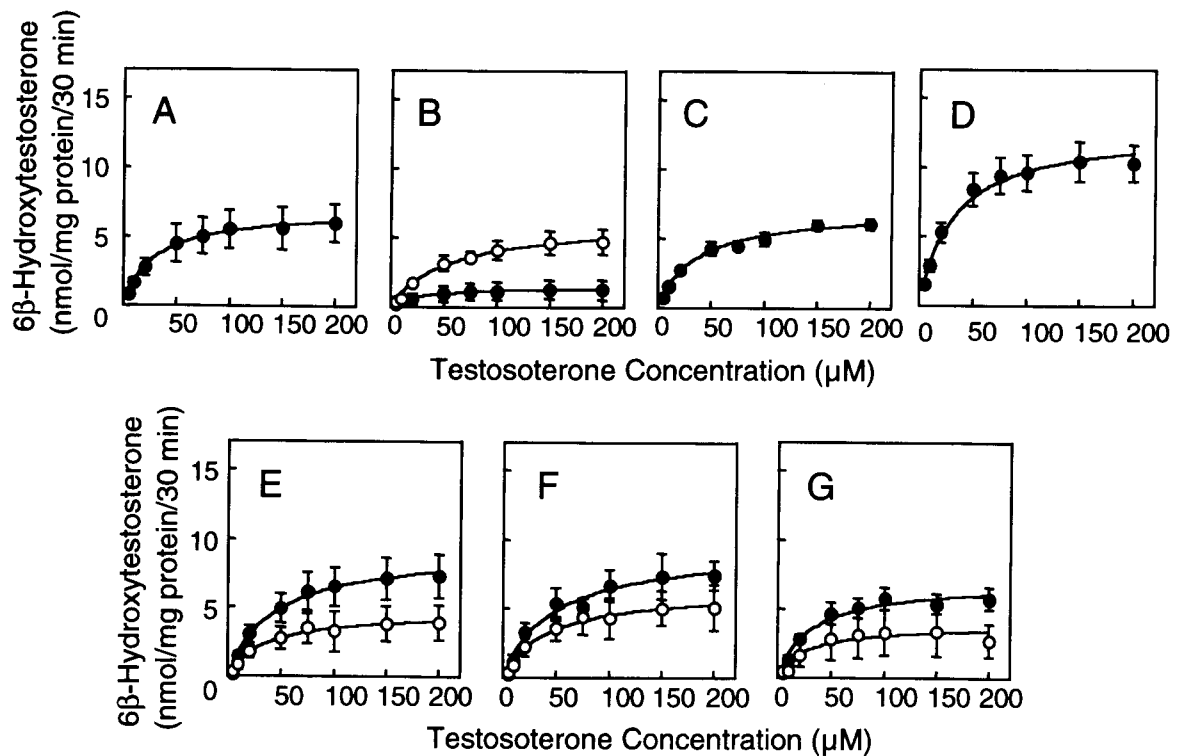
投与4時間後にはタクロリムスは小腸管腔内にほとんど残っていなかったことから、肝切除ラットにおいてもタクロリムスの小腸における吸収は極めて良好であることが示された。一方、肝切除後のラットでは小腸内に投与した場合の最高血中濃度は模擬処置ラットに比べ約3倍に上昇したが、小腸内投与時のバイオアベイラビリティは約2倍で血中濃度の上昇に比べて小さいものであった (Fig. III-5)。



**Fig. III-5 Bioavailability after partial hepatectomy.**  
Changes in bioavailability of tacrolimus in sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats. Results are based on the data of four to five rats.

## 第2節 部分肝切除後の肝 CYP3A 活性の評価

部分肝切除後は、肝臓における各種 CYP 分子種の発現変動が起きることが報告されている<sup>49, 50, 51)</sup>。そこで、タクロリムス代謝に関わる肝 CYP3A サブファミリーの発現変動に注目し、残存肝における代謝活性を評価した。肝切除後の肝臓における CYP3A 活性は、肝切除後の残存肝よりミクロソームを調製し、NADPH 生成系存在下テストステロン 6 $\beta$  水酸化活性を指標に測定した。肝ミクロソームにおけるテストステロン 6 $\beta$  水酸化体の生成は基質濃度上昇に伴い飽和性を示し、ミカエリスメンテン式に当てはめて得られた  $K_m$  値は術後すべての期間でほぼ一定であった (Fig. III-6、Table III-2)。 $V_{max}$  値は肝切除後 1 日目に低下が見られ、その後 4 日目に大きく上昇した後、模擬処置群程度まで低下した。 $V_{max}$  値を  $K_m$  値で除した固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) 値は  $V_{max}$  値の推移と同様に、肝切除後 1 日目に低下が見られ、その後 4 日目に大きく上昇した後、模擬処置



**Fig. III-6 Concentration dependence of testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation by liver microsomes.**

Liver microsomes used were prepared from rats at the different time points after partial hepatectomy (closed symbols) and sham operation (open symbols), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 7 (E), 14 (F) and 21 (G) day. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats.

群程度まで低下するという二相性の回復を示すことが明らかになった (Table III-2)。

### 第3節 考 察

生体部分肝移植は、胆道閉鎖症や劇症肝炎を始め様々な肝不全に対して救命的に行われる治療である。免疫抑制剤タクロリムスは肝移植後の拒絶反応抑制薬として用いられており、術後管理において非常に重要な役割を果たしている<sup>39-46)</sup>。タクロリムスは体内

**Table III-2**      **Changes in testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity of liver microsomes after partial hepatectomy**

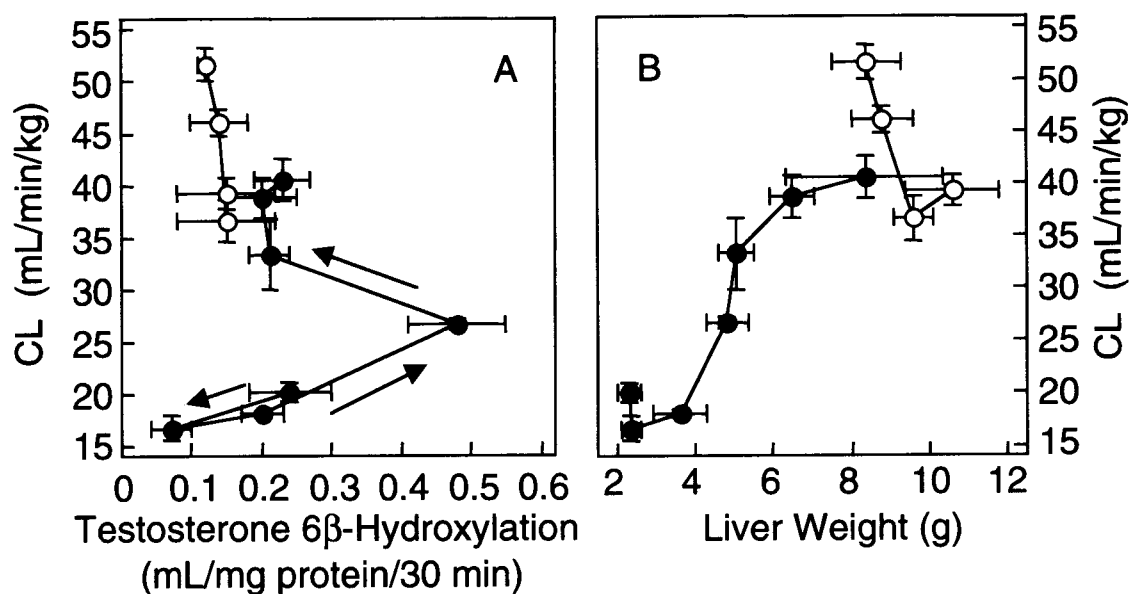
Days after Hepatectomy	0.5	1	2	4	7	14	21
Sham Operated Rats							
Km ( $\mu$ M)		52.5 $\pm$ 11.3			34.5 $\pm$ 5.3	41.7 $\pm$ 4.3	24.2 $\pm$ 2.5
Vmax (nmon/mg protein/30min)		6.3 $\pm$ 1.5			4.7 $\pm$ 1.7	6.4 $\pm$ 1.9	3.8 $\pm$ 2.0
CLint (mL/mg protein/30 min)		0.12 $\pm$ 0.01			0.14 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.07
Partially Hepatectomized Rats							
Km ( $\mu$ M)	29.2 $\pm$ 1.5	43.8 $\pm$ 27.1	36.9 $\pm$ 6.8	27.2 $\pm$ 4.5	41.9 $\pm$ 6.0	48.5 $\pm$ 4.9	30.7 $\pm$ 2.9
Vmax (nmol/mg protein/30 min)	6.9 $\pm$ 1.8	1.5 $\pm$ 0.8 *	7.2 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 1.7 *	9.2 $\pm$ 2.2	9.4 $\pm$ 1.4	6.9 $\pm$ 0.9
CLint (mL/mg protein/30 min)	0.24 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03 *	0.48 $\pm$ 0.07 *	0.21 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.04

Results are the mean  $\pm$  S.E. of three rats.

\*: Significantly different from sham operated controls,  $P < 0.05$

動態、特に経口投与時のバイオアベイラビリティの変動が大きいことが知られており投与設計が難しい薬物である<sup>1, 10, 47)</sup>。第I章において、経口投与されたタクロリムスは肝臓のみならず小腸においても代謝を受け、顕著な初回通過効果を受けることを明らかにした。一方、生体部分肝移植後の移植肝は再生しそのサイズが回復することが知られている。しかし、肝再生期におけるタクロリムス体内動態変動に関する検討はなされていない。そこで、本章では70%肝切除モデルラットを用い、肝再生期におけるタクロリムス体内動態の変動について、機能的変化を中心に検討した。

静脈内投与後の血中濃度推移より、タクロリムスの体内動態パラメータを算出したところ、タクロリムスの全身クリアランスは、肝重量に変化が見られず肝臓におけるCYP3A活性が低下する肝切除2日目までは減少した (Fig. III-2、Table III-2)。一方、タ

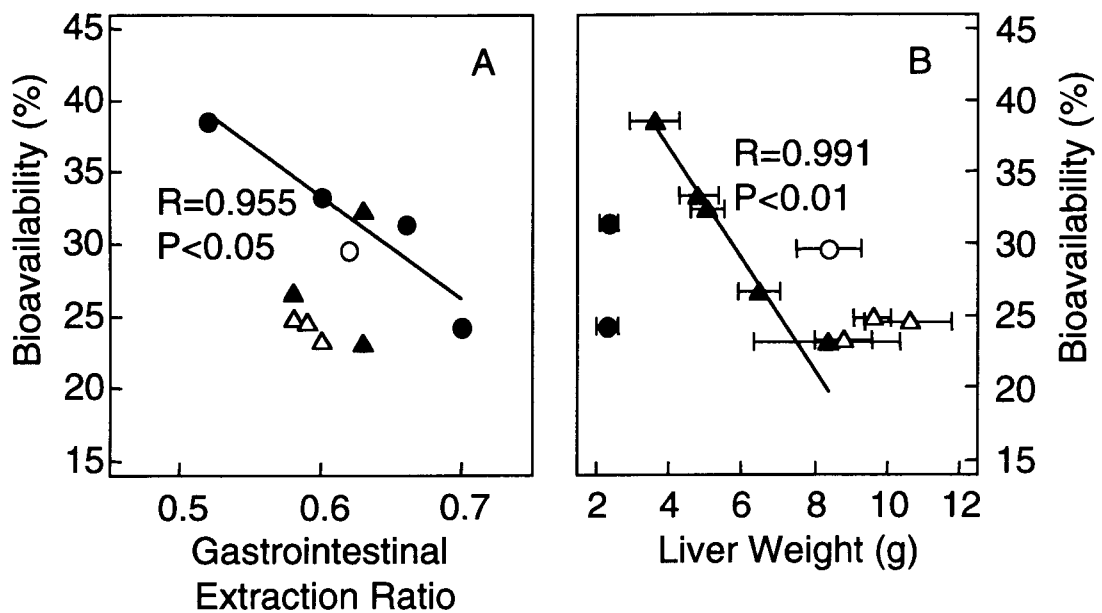


**Fig. III-7 Changes in total clearance of tacrolimus after intravenous infusion.** (A) Relation between total clearance and testosterone 6β-hydroxylase activity of sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats. (B) Relation between total clearance and liver weight of sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats. Each point represents the mean ± S.E. of four to five rats.

タクロリムスは主に肝 CYP3A によって代謝され消失するが<sup>1, 2, 6, 10)</sup>、肝切除後 4 日以後は CYP3A 活性ではなく肝重量の増加に伴って全身クリアランスの回復が認められた (Fig. III-7)。模擬処置群における全身クリアランスは 51.6 mL/min/kg と算出され、肝血流量の約 80%であった。これらの結果より、タクロリムスの全身クリアランスは残存肝重量によって影響を受ける肝血流量によって支配されることが示された。さらに、肝重量が変化しない期間だけは、肝 CYP3A 活性に依存することが明らかとなった。また、中心コンパートメントの分布容積  $V_1$  は模擬処置群で 439.2 mL/kg、肝切除 1 日目で 328.6 mL/kg であり、タクロリムスは肝臓への分布が非常に大きいことが明らかになった。

CYP3A サブファミリーは雄性ラットの肝臓において CYP3A2, 3A9, 3A18, 3A23 の 4 分子種が発現していることが報告されている<sup>25-34)</sup>。肝切除によって CYP3A の発現量が一時的に低下することが報告されているが<sup>49)</sup>、すべての分子種に関する詳細な検討はなされていない。本章においても肝切除によって CYP3A 活性は一時的に低下し、その後一過性に上昇するという二相性の回復を示した。CYP3A サブファミリーのうち、どの分子種がタクロリムスの代謝に関わっているかは不明であり、本章ではテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性を指標に CYP3A 活性として評価したが、これらがタクロリムスのクリアランスと関連しない原因の可能性も考えられた。一方、ヒトではタクロリムスは主に肝臓においてもっとも含量が多い CYP3A4 によって代謝されるが、CYP3A4 のアイソフォームである CYP3A5 の寄与については不明である。また、CYP3A4、3A5 のどちらの分子種についても多くの遺伝子多型が存在することが知られており、それらの関与についても不明である<sup>52, 53)</sup>。さらに、近年 CYP3A43 もクローニングされたが機能については不明であり<sup>54, 55)</sup>、タクロリムス代謝に関してはさらなる研究が必要であると考えられる。

肝切除後のラットにおける、タクロリムス静脈、門脈及び小腸内投与後の血中濃度推移より、小腸における抽出率を算出し小腸内投与後のバイオアベイラビリティとの相関を Fig. III-8-A に示した。肝切除後 4 日間は小腸における抽出率とバイオアベイラビリティとの間に非常によい負の相関が見られたが、7 日以降は相関が見られなかった。一方、肝重量と小腸内投与後のバイオアベイラビリティの相関を検討した結果、肝切除後 2 日以降は非常によい負の相関が見られることが明らかになった (Fig. III-8-B)。術後 2~4

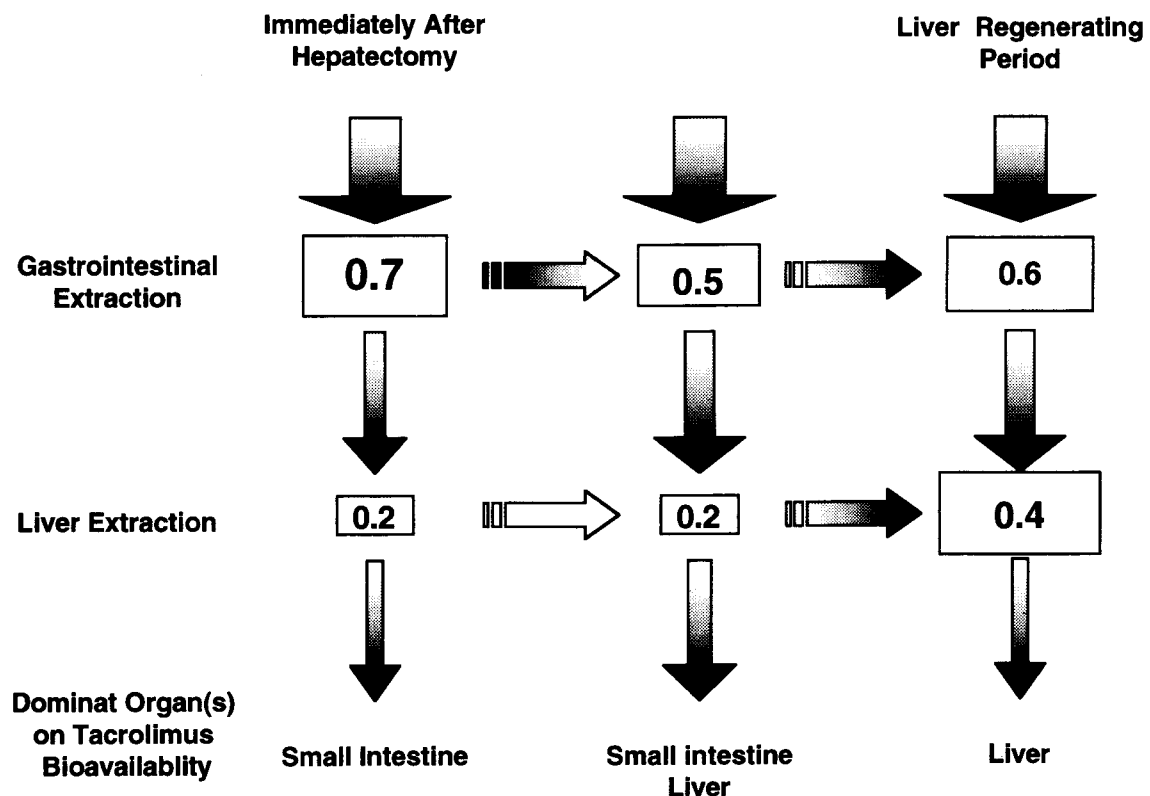


**Fig. III-8 Changes in bioavailability of tacrolimus after intraintestinal injection.**

(A) Relation between bioavailability and gastrointestinal extraction ratio of sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats. Although bioavailability was closely related to the gastrointestinal extraction ratio for 4 days after resection (circle symbols), bioavailability was not related after 7th day (triangle symbols). (B) Relation between bioavailability and liver weight of sham operated (open symbols) and partially hepatectomized (closed symbols) rats. After 2nd day (triangle symbols), a good correlation was seen between the bioavailability and the liver weight, and was not seen for 1 day (circle symbols). Results are based on the data of four to five rats.

日ではバイオアベイラビリティに対し、小腸における抽出率及び肝重量の双方に相関を示すことから、小腸における抽出率及び肝重量の両方の寄与が同程度であることが示唆された。これらの結果より、肝再生期におけるタクロリムス体内動態変動には三段階の回復過程が存在することが推察された。即ち、肝切除後初期では、タクロリムスのバイオアベイラビリティの変動は肝初回通過効果をほとんど受けないために、小腸における初回通過効果に大きく影響されること、さらに、肝初回通過効果及び小腸における初回通過効果の両方に影響を受ける時期を経て、肝重量回復期には主に肝臓における初回通過効果の変動の影響を受けることが示唆された (Fig. III-9)。また、Hashida ら<sup>47)</sup>は生体

部分肝移植後の患者において、移植後1週間はタクロリムスの血中濃度/投与量比が小腸MDR1 mRNAの発現量と負の相関を示すことを報告している。小腸MDR1の発現量は、小腸におけるタクロリムス初回通過効果を調節する因子として考えられ、移植直後の肝初回通過の寄与が小さい時期では、小腸における初回通過効果の変動に大きな影響を受けるという本章における結果と一致する。しかしながら、タクロリムスの初回通過効果における肝初回通過効果の寄与は肝再生が進むにつれて大きくなっていき、小腸における初回通過効果の寄与よりも大きくなったときには、タクロリムスの体内動態は肝再生における個体差に大きく依存することになると考えられる。そのため、生体部分肝移植後の患者では、移植肝の再生をモニタリングすることによってタクロリムス体内動態を



**Fig. III-9** A schematic diagram depicting the process of first-pass extraction in partially hepatectomized rats following an oral administration of tacrolimus. In this study, the results indicated that there were three stages of change in tacrolimus pharmacokinetics.



予測できる可能性がある。

以上の結果より肝切除直後では、タクロリムスバイオアベイラビリティの変動は肝初回通過効果をほとんど受けないために、小腸における初回通過効果に大きく依存すること、肝初回通過効果及び小腸における初回通過効果の両方に影響を受ける時期を経た後、主に肝重量の回復に応じて初回通過効果が変動することが示された。

## 結 論

以上、著者は免疫抑制剤タクロリムスの初回通過効果における小腸の役割を解明するため、三章にわたる研究を行い、以下の結論を得た。

### 第I章 タクロリムスの初回通過効果における小腸及び肝臓の役割

タクロリムスの小腸及び肝臓における初回通過効果を比較解析するため、タクロリムスを静脈、門脈、あるいは小腸管腔内に投与し経時的に採血した。門脈内投与後のタクロリムス血中濃度は、静脈内投与後の血中濃度と比べて大きく低下しており、タクロリムスが肝臓において顕著な初回通過効果を受けることが明らかになった。一方、タクロリムスを小腸管腔内に投与したところほぼ完全に吸収されたにもかかわらず、そのAUCは門脈内投与時と比較して大きく低下しており、タクロリムスが小腸組織中で消失することが示された。タクロリムスの血中濃度推移からバイオアベイラビリティ及び抽出率を算出した結果、小腸内投与時のバイオアベイラビリティは26.2%であり、タクロリムスは肝臓において約60%、小腸において約35%の抽出率で除去されることが明らかとなった。また摘出反転腸管を用いた検討から、タクロリムスは小腸組織中で代謝されることが認められた。さらに、CYP3Aの阻害剤であるミコナゾールの共存によって、摘出反転腸管でのタクロリムスの代謝活性が完全に阻害されたことから、タクロリムスは小腸においてもCYP3Aを介した初回通過効果を受けることが明らかとなった。

### 第II章 小腸部位差に着目したタクロリムス初回通過効果の比較解析

生体部分小腸移植では、ドナーの安全性を重視した術式の観点から回腸が移植片として選択されることが多いが、術後管理の中心となるタクロリムスの動態特性に着目した移植片選択の妥当性に関する情報はほとんど無い。そこで、摘出反転腸管におけるタクロリムス代謝活性の小腸部位差に関する検討を行った。反転腸管におけるタクロリムス

の消失速度は、十二指腸>空腸>回腸の順となり、タクロリムス代謝活性の部位差が明確となった。また、空腸もしくは回腸を切除し、タクロリムス体内動態を解析したところ、模擬処置ラットに比べてタクロリムスのバイオアベイラビリティは何れの部分小腸切除ラットにおいても顕著に上昇し、小腸を切除することによって吸収障壁としての機能が低下することが示唆された。さらに、空腸切除ラットにおいて、タクロリムスの吸収遅延と最高血中濃度/最低血中濃度比の低下が認められた。以上、空腸及び回腸はそれぞれ異なる機能的特徴を有していること、回腸を用いた生体部分小腸移植ではタクロリムスの最高血中濃度が低く維持されること、即ち術後管理の面からも空腸移植より優れていることが示唆された。

### 第 III 章 部分肝切除ラットにおけるタクロリムスの初回通過効果

生体部分肝移植術後の移植肝は経日的に再生し増大する。タクロリムスをはじめ、多くの薬物が肝臓において代謝・排泄を受けることから、肝再生期における薬物動態の変動を明らかにすることは、肝移植患者に対する薬物投与設計を行う上で重要と考えられる。そこで70%肝切除ラットを作製し、肝再生期におけるタクロリムス体内動態の変動について機能面を中心に検討した。静脈内投与時の血中濃度推移より求めたタクロリムスの全身クリアランスは、肝重量の増加が見られない肝切除2日目まで低下し、以降は肝重量の増加に伴って回復した。肝切除ラットではタクロリムス小腸内投与時のバイオアベイラビリティが、肝切除4日目までの間、小腸における抽出率と良好な負の相関を示した。肝切除2日目以降は肝重量との間に良好な負の相関を示し、術後2～4日では小腸における抽出率及び肝重量の両方の寄与が同程度であることが示唆された。以上の結果より、肝切除直後ではタクロリムスのバイオアベイラビリティは小腸における初回通過効果に大きく依存すること、肝再生期では主に肝重量の回復に応じた初回通過効果の増大を示すこと、即ちタクロリムス体内動態に対する支配臓器の転換を見出すことができた。

以上著者は、経口投与された免疫抑制剤タクロリムスが肝臓のみならず小腸においても顕著な初回通過効果を受けることを明らかにした。また、タクロリムス初回通過効果に対する小腸各部位の機能的役割や、肝再生期における小腸及び肝臓の寄与について新知見を得た。本研究成果は、タクロリムス体内動態の変動機構を解明し、臓器移植患者に対するタクロリムスの適正使用を推進する上で、有用な基礎的知見になると考える。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 乾 賢一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御指導と御助言を戴いた富山医科薬科大学 橋本征也教授、熊本大学 齋藤秀之教授、京都大学 奥田真弘助教授、同増田智先助手、並びに同附属病院薬剤部諸氏に深謝致します。さらに、部分小腸切除ラット及び部分肝切除ラット作製にあたり御指導頂いた京都大学 田中紘一教授、三重大学 上本伸二教授に感謝致します。

最後に本研究の実験の一部に御協力を戴いた笹 洋明修士、山口紗央里学士に深く感謝します。

## 実験の部

本研究に際して、試薬及び定量は特記しない限り以下の方法を用いた。

### 試薬

#### 藤沢薬品工業

tacrolimus (プログラフ<sup>®</sup>注射液、原末)

#### 大日本製薬

sodium pentobarbital (ネンブタール<sup>®</sup>注射液)

#### Sigma-Aldrich

(±)-miconazole

#### CIS Bio International

monoclonal antibody C219

#### Santa Cruz Biotechnology

polyclonal antibody to villin

#### ナカライテスク

testosterone,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), glucose 6-phosphate (G6P), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

#### Ultrafine Chemicals

6 $\beta$ -hydroxytestosterone

その他の試薬は市販特級品を用いた。

### 定量

#### タクロリムス血中濃度

MEIA 法 (IMx<sup>®</sup> タクロリムス II ダイナパック<sup>®</sup>、ダイナボット) で定量した<sup>10, 56)</sup>。

#### タクロリムス未変化体濃度 (HPLC-MEIA 法)

採取したサンプル 100  $\mu$ L に沈澱試薬 (メタノール (MeOH) 50%、エチレングリコール 30%、水 ( $H_2O$ ) 20% 及び  $ZnSO_4$  100 mM) 200  $\mu$ L を加え、 $-20^{\circ}C$  で 30 分間静置した。 $4^{\circ}C$  下遠心分離後上清 0.18 mL を HPLC で分画した。HPLC には、LC-9A ポンプ (島津製作所)、CTO-10A カラムオーブン、ガードフィルター Sumipax Filter PG-ODS (住化分析センター)、分析カラム ChemcoPak<sup>®</sup> (Chemcosorb 5-ODS-H、4.6x150 mm、ケムコ)、SPD-2A 分光検出器、C-R6A クロマトパック、SCL-10A システムコントローラ (島津製作所) を使用した。移動相は MeOH: $H_2O$ =80:20、移動相流速は 1 mL/min、カラム温度は  $60^{\circ}C$  に設定した。タクロリムスの標準液 (10  $\mu$ g/mL) を UV 214 nm で検出することによって HPLC における保持時間を測定し、保持時間 (約 5.7 分) の前後 1 分ずつを未変化体画分として分取した。溶媒除去後、沈澱試薬に再溶解してブランク全血を用いて MEIA 法で定量した<sup>10)</sup>。もしくは、溶媒除去後、MeOH:saline=3:7 からなる試薬に再溶解し MEIA 法で定量した<sup>57)</sup>。

#### 6 $\beta$ 水酸化テストステロン

ミクロソーム反応液 100  $\mu$ L を MeOH 200  $\mu$ L によって除蛋白を行い、 $4^{\circ}C$  下遠心分離後、上清 50  $\mu$ L を HPLC で定量した。HPLC には、LC-10AVP ポンプ二台 (島津製作所)、ガードフィルター Sumipax Filter PG-ODS (住化分析センター)、分析カラム ZORBAX<sup>®</sup> (ODS 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm、Hewlett-Packard)、SPD-10AVP 分光検出器、C-R6A クロマトパック、SCL-10AVP システムコントローラ、SIL-10ADVP オートサンプラー (島津製作所) を使用した。移動相は MeOH: $H_2O$ =70:30、移動相流速は 1 mL/min、カラム温度は  $40^{\circ}C$  に設定した。6 $\beta$  水酸化テストステロンの検出は UV 240 nm で行った<sup>58)</sup>。

#### 総胆汁酸

市販のアッセイキット (総胆汁酸-テストワコー、和光純薬工業) を用い、酵素比色法により測定した。

#### ALT、AST

市販のアッセイキット (トランスアミラーゼ CII-テストワコー、和光純薬工業) を用い、POP・TOOS 法により測定した。

# 第 I 章 実験の部

## 第 1 節

### 【1】実験動物

Wistar/ST 系雄性ラット (清水実験材料) を使用した。ラットは実験に用いるまで恒温 (22-24℃)、水と固形飼料を自由に摂取条件下で飼育した。なお、小腸内投与実験前には 18 時間絶食させた。実験開始時におけるラットの体重は、225 - 270 g であった。動物実験は、京都大学動物実験に関する指針を遵守し行った。

### 【2】*In vivo* 体内動態実験<sup>10)</sup>

#### (1) 動物の処置

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、大腿動脈 (SP31、夏目製作所) にカニュレーション手術を施した。なお、カニュレには予めヘパリン (100 IU/mL) を満たしておき、カニュレーション終了時に大腿動脈から採血を行いブランク血として用いた。静脈内投与時には、頸静脈 (PE-10、Clay Adams) にカニュレーション手術を施した。門脈投与時には、腹部を正中切開し門脈 (PE-10) にカニュレーション手術を施した。小腸内投与時には、腹部を正中切開し十二指腸の胆管出口直上を絹糸で結紮した。

#### (2) 投与量及び投与方法

静脈内及び門脈内投与時には、生理食塩水によってプログラフ® 注を希釈しカニュレーションチューブを介して頸静脈もしくは門脈より定速 (2.2 mL/kg/hr) で 1 時間持続注入 (タクロリムス 1.0 mg/kg/hr もしくは 0.3 mg/kg/hr) を行った。

小腸内投与時には、生理食塩水によってプログラフ® 注を希釈し、十二指腸結紮部直下に瞬時投与 (タクロリムス 1.0 mg/kg、2 mL/kg) した。

#### (3) 採血

静脈内及び門脈内投与時には、薬物投与開始後 15、30、60、65、75、90、120、180、240 分にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 処理を施したマイクロチューブを用いて採血を行い、定量まで -20℃ で保存した。小腸内投与時には、薬物投与開始後 15、30、45、60、75、90、120、180、240 分に採血を行った。なお、小腸内投与実験終



了後に、管腔内を洗い込み、吸収されずに残存した薬物量を測定した。タクロリムスの定量は HPLC-MEIA 法で行った。

### 【3】薬物動態パラメータの算出

タクロリムスの静脈内投与後の薬物動態パラメータは、NONMEM ソフトウェア (double precision NONMEM Version IV and PREDPP Version III) を用いて算出した。2-コンパートメントモデル用 PREDPP サブルーチンの ADVAN3 と TRANS3 を用いて、全身クリアランス (CL)、中心コンパートメントの分布容積 ( $V_1$ )、インターコンパートメンタルクリアランス (Q)、定常状態の分布容積 ( $V_{ss}$ ) を求めた<sup>59)</sup>。

門脈内及び小腸内投与時の見かけの全身クリアランス (CL/F) は、台形公式及び最終採血点における血中濃度と消失速度定数の外挿により求めた、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を用い、投与量/AUC の計算式により算出した。バイオアベイラビリティ (F) は門脈及び小腸内投与時の CL/F、及び静脈内投与時の CL より求めた<sup>10)</sup>。

## 第2節

### ラット摘出反転腸管法

Wistar/ST 系雄性ラットを用いてペントバルビタール麻酔下で開腹し、小腸上部を 15 cm ほど取り出して生理的食塩水で洗浄した。その後、既報に準じて 10 cm の反転腸管を作製し<sup>60)</sup>、内側 (漿膜側) に Krebs-Henseleit Bicarbonate Buffer (KHBB、Table I-5) を 1 mL 入れて両端を糸で結紮した。作製した反転腸管を、グルコース 5 mM、タクロリムス 500 nM に調製した KHBB 30 mL 中で、60 分間インキュベートした。インキュベーター中はバッファーを 37℃ に保ち、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> ガスで酸素化した。またタクロリムスの代謝阻害剤は、ミコナゾールを 20 μM の濃度で共

**Table I-5 The composition of Krebs-Henseleit bicarbonate buffer**

NaCl	115.0 mM
KCl	4.7 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.0 mM

存させることにより行った。インキュベート後、粘膜側、漿膜側の液をサンプリングすると共に、小腸組織内のタクロリムスの濃度を測定するため、小腸組織に9倍量のKHBBを加えホモジネートした。タクロリムスの定量はHPLC-MEIA法で行った。

### 第3節

#### 【1】ミクロソームの作製

小腸及び肝臓ミクロソームは常法に従って作製した<sup>61)</sup>。即ち、Wistar/ST系雄性ラットを用いてペントバルビタール麻酔下で開腹し、門脈より生理食塩水を流し込み肝臓内より脱血した後に肝臓を摘出した。また、小腸上部を10 cm取り出して生理食塩水で洗浄した。小腸管腔を切り開いた後、mucosa部分をかきとった。組織重量の4倍の0.15 M塩化カリウム溶液を加えPotter-Elvehjemホモジナイザーを用いてホモジネートを作製した。ホモジネートは冷却遠心機(日立 High Speed Refrigerated Centrifuge SCR 20B (rotor: RPR20-2))を用いて12,500 gで15分間遠心した後、上清を超遠心機(日立 Ultracentrifuge 65P-7 (rotor: RPR50T))を用いて100,000 gで60分間遠心しミクロソーム画分を分離した。ミクロソームは100 mMカリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)に再懸濁し、実験に用いるまで-80℃で保存した。ミクロソーム画分における蛋白量は、牛 $\gamma$ -globulinを標準物質としてBradfordの方法に準じてBio-Rad Protein Assay Kitを用いて定量を行った<sup>62)</sup>。

#### 【2】ミクロソームにおけるCYP3A活性の評価

反応液(0.5 mL)は、小腸及び肝臓ミクロソーム(タンパク量1 mg(小腸)、0.01 mg(肝臓))、100 mMカリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)、NADPH生成系(1.5 mM NADP、12 mM G6P、0.25 I.U. G6PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)からなり、テストステロン200  $\mu$ Mを加え37℃でインキュベートした。反応の開始はNADPを加えることによって行った<sup>63)</sup>。CYP3A活性はテストステロン6 $\beta$ 水酸化体の生成を指標に評価した。

### 【3】 摘出反転腸管における CYP3A 活性の評価

第 2 節に準じて行った。

反転腸管を、グルコース 5 mM、テストステロン 200  $\mu$ M に調製した KHBB 30 mL 中で、60 分間インキュベートした。インキュベート中はバッファーを 37℃ に保ち、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> ガスで酸素化した。また、代謝阻害剤としてミコナゾール 20  $\mu$ M 及びタクロリムス 20  $\mu$ M を用いた。CYP3A 活性はテストステロン 6 $\beta$  水酸化体の生成を指標に評価した。

## 第 II 章実験の部

### 第 1 節

#### ラット摘出反転腸管法

第 I 章第 2 節に準じ、一部変更して行った。

十二指腸、空腸、回腸の各部位より 15 cm の反転腸管を作製し、漿膜側に等張リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 2 mL 入れて両端を糸で結紮した。作製した反転腸管を、グルコース 5 mM、タクロリムス 10  $\mu$ M に調製した等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) 30 mL 中で、60 分間インキュベートした。またタクロリムスの代謝阻害は、ミコナゾールを 10  $\mu$ M の濃度で共存させることにより行った。タクロリムスの定量は HPLC-MEIA 法で行った。

### 第 2 節

#### 【1】 小腸部分切除

9 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC) を使用した。ラットは手術まで恒温 (22-24℃)、水と固形飼料を自由に摂取条件下で飼育した。なお、手術前には 18 時間絶食させた。手術は、15 cm の空腸もしくは回腸を切除し、両端を連続吻合することによって行った<sup>64, 65)</sup>。術後は水のみを与え、24 時間後から給餌を再開した。7 日間飼育した後 *in vivo* 体内動態実験に供した。

#### 【2】 組織学的解析

組織学的検討に用いたサンプルは小腸より切り出しパラフィン包埋した。4  $\mu$ m の厚さ

にスライスし、ヘマトキシリン-エオシン染色し、顕微鏡下で観察した。

### 【3】 ウェスタンブロット解析

小腸粗膜画分は既報に準じて調製した<sup>66)</sup>。レーンあたり 25  $\mu$ g の膜サンプルを SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜 (Immobilon-P、Millipore) に電気ブロットにより転写した。Pgp の検出には C219 モノクローナル抗体 (200 ng/mL) を<sup>47, 67, 68)</sup>、内部標準 villin の検出にはポリクローナル抗体 (1000 倍希釈) を用いた。バンド強度は NIH image 1.61 を用いて数値化し、Pgp の villin に対する比を Pgp 発現量とした<sup>47)</sup>。

### 【4】 *In vivo* 体内動態実験

第 I 章第 1 節【2】に準じて、静脈及び小腸内投与実験を行った。

なお、静脈内投与時の投与ルートは大腿静脈 (PE-10) にカニューレーション手術を施し、確保した。また、小腸内投与時の採血時間を 8、15、30、45、60、75、90、120、180、240 分に設定した。タクロリムスの定量は MEIA 法を用いた。

### 【5】 薬物動態パラメータの算出

第 I 章第 1 節【3】に準じて、行った。

なお、小腸内投与時の吸収速度定数は 1 次吸収 1-コンパートメントモデル用 PREDPP サブルーチンの ADVAN2 と TRANS2 を用いて求めた。

## 第 III 章実験の部

### 第 1 節

#### 【1】 70%部分肝切除

9 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC) を使用した。ラットは手術まで恒温 (22-24℃)、水と固形飼料を自由に摂取条件下で飼育した。部分肝切除は、Higgins と Anderson の手技を用い中央及び左葉を結紮し、肝重量の 70%を切除した<sup>68,71)</sup>。肝切除後 0.5、1、2、4、7、14、21 日のラットを *in vivo* 実験に供した。

## **【2】 *In vivo* 体内動態実験**

第 I 章第 1 節 **【2】** に準じて行った。

なお、静脈内投与時の投与ルートは大腿静脈 (PE-10) にカニュレーション手術を施し、確保した。また、小腸内投与時の採血時間を 8、15、30、45、60、75、90、120、180、240 分に設定した。タクロリムスの定量は MEIA 法を用いた。

## **【3】 薬物動態パラメータの算出**

第 I 章第 1 節 **【3】** に準じて行った。

## **第 2 節**

### **【1】 ラット肝臓ミクロソームの作製**

第 I 章第 3 節 **【1】** に準じて行った。

なお、肝切除後 0.5、1、2、4、7、14、21 日の Wistar 系雄性ラットの残存肝より調製した。

### **【2】 ミクロソームにおける CYP3A 活性の評価**

第 I 章第 3 節 **【2】** に準じて行った。

なお、肝臓ミクロソームは反応液中に 0.1 mg 加えた。

## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Effects of intestinal and hepatic metabolism on the bioavailability of tacrolimus in rats.

*Pharmaceutical Research* **15**:1609-1613, 1998

Roles of the jejunum and ileum in the first-pass effect as absorptive barriers for orally administered tacrolimus.

*Journal of Surgical Research* **103**:215-222, 2002

First-pass effect of tacrolimus during liver regeneration in the partially hepatectomized rats.

in preparation

## 引用文献

1. Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V., McMichael, J., Lever, J., Burckart, G. and Starzl, T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin. Pharmacokinet.* **29**: 404-430, 1995.
2. Jacobson, P., Uberti, J., Davis, W. and Ratanatharathorn, V. Tacrolimus: a new agent for the prevention of graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **22**: 217-225, 1998.
3. del Mar Fernandez De Gatta, M., Santos-Buelga, D., Dominguez-Gil, A. and Garcia, M.J. Immunosuppressive therapy for paediatric transplant patients: pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* **41**: 115-135, 2002.
4. Kahan, B.D., Keown, P., Levy, G.A. and Johnston, A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin. Ther.* **24**: 330-350, 2002.
5. Dumont, F.J. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med. Chem.* **7**: 731-748, 2000.
6. Gupta, A.K., Adamiak, A. and Chow, M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *JEADV* **16**: 100-114, 2002.
7. Yoshikawa, H., Iwasa, K., Satoh, K. and Takamori, M. FK506 prevents induction of rat experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Autoimmun.* **10**: 11-16, 1997.
8. Yasuhara, M., Hashida, T., Toraguchi, M., Hashimoto, Y., Kimura, M., Inui, K., Hori, R., Inomata, Y., Tanaka, K. and Yamaoka, Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of FK 506 in pediatric patients receiving living-related donor liver transplantations. *Transplant. Proc.* **27**: 1108-1110, 1995.
9. Jusko, W.J., Piekoszewski, W., Klintmalm, G.B., Shaefer, M.S., Hebert, M.F., Piergies, A.A., Lee, C.C., Schechter, P. and Mekki, Q.A. Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **57**: 281-290, 1995.
10. Sasa, H., Hashimoto, Y., Shimizu, T. and Inui, K. Hepatic extraction of tacrolimus in rats

- with experimental liver diseases. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 610-614, 1998.
11. Iwasaki, K., Shiraga, T. and Hata, T. Metabolism of tacrolimus (FK506) and its metabolite by rat liver microsomes. *Xenobiotic. Metab. Dispos.* **13**: 472-477, 1998.
  12. Iwasaki, K., Shiraga, T., Matsuda, H., Teramura, Y., Kawamura, A., Hata, T., Ninomiya, S. and Esumi, Y. Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. *Xenobiotic. Metab. Dispos.* **13**: 259-265, 1998.
  13. Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Molowa, D.T. and Guzelian, P.S. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J. Clin. Invest.* **80**: 1029-1036, 1987.
  14. Kolars, J.C., Schmiedlin-Ren, P., Schuetz, J.D., Fang, C. and Watkins, P.B. Identification of rifampin-inducible P450III<sub>A4</sub> (CYP3A<sub>4</sub>) in human small bowel enterocytes. *J. Clin. Invest.* **90**: 1871-1878, 1992.
  15. Kolars, J.C., Schmiedlin-Ren, P., Dobbins III, W.O., Schuetz, J., Wrighton, S.A. and Watkins, P.B. Heterogeneity of cytochrome P450III<sub>A</sub> expression in rat gut epithelia. *Gastroenterology* **102**: 1186-1198, 1992.
  16. Paine, M.F., Shen, D.D., Kunze, K.L., Perkins, J.D., Marsh, C.L., McVicar, J.P., Barr, D.M., Gillies, B.S. and Thummel, K.E. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**: 14-24, 1996.
  17. Floren, L.C., Bekersky, I., Benet, L.Z., Mekki, Q., Dressler, D., Lee, J.W., Roberts, J.P. and Hebert, M.F. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.* **62**: 41-49, 1997.
  18. Lown, K.S., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Janardan, S.K., Adair, C.H., Fortlage, L.A., Brown, M.B., Guo, W. and Watkins, P.B. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* **99**: 2545-2553, 1997.
  19. Gomez, D.Y., Wacher, V.J., Tomlanovich, S.J., Hebert, M.F. and Benet, L.Z. The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine.



- Clin. Pharmacol. Ther.* **58**: 15-19, 1995.
20. Thummel, K.E., O'Shea, D., Paine, M.F., Shen, D.D., Kunze, K.L., Perkins, J.D. and Wilkinson, G.R. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**: 491-502, 1996.
  21. Fromm, M.F., Busse, D., Kroemer, H.K. and Eichelbaum, M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* **24**: 796-801, 1996.
  22. Watkins, P.B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **27**: 161-170, 1997.
  23. Lown, K.S., Mayo, R.R., Leichtman, A.B., Hsiao, H., Turgeon, D.K., Schmiedlin-Ren, P., Brown, M.B., Guo, W., Rossi, S.J., Benet, L.Z. and Watkins, P.B. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **62**: 248-260, 1997.
  24. Kagayama, A., Tanimoto, S., Fujisaki, J., Kaibara, A., Ohara, K., Iwasaki, K., Hirano, Y. and Hata, T. Oral absorption of FK506 in rats. *Pharm. Res.* **10**: 1446-1450, 1993.
  25. Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., Hardwick, J.P. and Kasper, C.B. Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16  $\alpha$ -carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family. *J. Biol. Chem.* **260**: 7435-7441, 1985.
  26. Gonzalez, F.J., Song, B. and Hardwick, J.P. Pregnenolone 16  $\alpha$ -carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2969-2976, 1986.
  27. Strotkamp, D., Roos, P.H. and Hanstein, W.G. A novel CYP3 gene from female rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1260**: 341-344, 1995.
  28. Nagata, K., Murayama, N., Miyata, M., Shimada, M., Urahashi, A., Yamazoe, Y. and Kato, R. Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450<sub>6 $\beta$ -2</sub> catalyzing testosterone 6 $\beta$ - and 16  $\alpha$ -hydroxylations. *Pharmacogenetics* **6**: 103-111, 1996.

29. Kirita, S. and Matsubara, T. cDNA cloning and characterization of a novel member of steroid-induced cytochrome P450 3A in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 253-258, 1993.
30. Komori, M. and Oda, Y. A major glucocorticoid-inducible P450 in rat liver is not P450 3A1. *J. Biochem.* **116**: 114-120, 1994.
31. Strotkamp, D., Roos, P.H. and Hanstein, W.G. EMBL/GenBank Data Libraries, accession No. X96721, 1996.
32. Miyata, M., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R. EMBL/GenBank Data Libraries, accession No. L24207, 1993.
33. Nagata, K. Multiple forms of steroid 6 $\beta$ -hydroxylase (CYP3A) and the gene expression. *Xenobiotic. Metab. Dispos.* **11**: 427-435, 1996.
34. Mahnke, A., Strotkamp, D., Roos, P.H., Hanstein, W.G., Chabot, G.G. and Nef, P. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 62-68, 1997.
35. Masuda, S., Uemoto, S., Hashida, T., Inomata, Y., Tanaka, K. and Inui, K. Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in a living-donor small bowel recipient. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**: 98-103, 2000.
36. Kiyozaki, H., Kobayashi, E., Toyama, N. and Miyata, M. Segmental small bowel transplantation in the rat: comparison of lipid absorption between jejunal and ileal grafts. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **20**: 67-70, 1996.
37. Trezise, A.E., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepúlveda, F.V., Buchwald, M. and Higgins, C.F. The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.* **11**: 4291-4303, 1992.
38. Fisher, J.M., Wrighton, S.A., Calamia, J.C., Shen, D.D., Kunze, K.L. and Thummel, K.E. Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**: 1143-1150, 1999.
39. Busuttill, R.W. and Holt, C.D. Tacrolimus is superior to cyclosporine in liver

- transplantation. *Transplant. Proc.* **30**: 2174-2178, 1998.
40. Jain, A., Reyes, J., Kashyap, R., Rohal, S., Abu-Elmagd, K., Starzl, T. and Fung, J. What have we learned about primary liver transplantation under tacrolimus immunosuppression? Long-term follow-up of the first 1000 patients. *Ann. Surg.* **230**: 441-449, 1999.
  41. Kiuchi, T., Inomata, Y., Uemoto, S., Asonuma, K., Egawa, H., Hayashi, M., Fujita, S. and Tanaka, K. Living-donor liver transplantation in Kyoto, 1997. *Clin. Transpl.* **18**: 191-198, 1997.
  42. Inomata, Y., Kiuchi, T., Kim, I., Uemoto, S., Egawa, H., Asonuma, K., Fujita, S., Hayashi, M. and Tanaka, K. Auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation as an aid for small-for-size grafts in larger recipients. *Transplantation* **67**: 1314-1319, 1999.
  43. Inomata, Y., Uemoto, S., Asonuma, K., Egawa, H., Kiuchi, T., Fujita, S., Hayashi, M., Kawashima, M. and Tanaka, K. Right lobe graft in living donor liver transplantation. *Transplantation* **69**: 258-264, 2000.
  44. Broelsch, C.E., Whittington, P.F., Emond, J.C., Heffron, T.G., Thistlethwaite, J.R., Stevens, L., Piper, J., Whittington, S.H. and Lichtor, J.L. Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann. Surg.* **214**: 428-439, 1991.
  45. de Ville de Goyet, J., Hausleithner, V., Reding, R., Lerut, J., Janssen, M. and Otte, J. Impact of innovative techniques on the waiting list and results in pediatric liver transplantation. *Transplantation* **56**: 1130-1136, 1993.
  46. Tanaka, K., Uemoto, S., Tokunaga, Y., Fujita, S., Sano, K., Yamamoto, E., Sugano, M., Awane, M., Yamaoka, Y., Kumada, K. and Ozawa, K. Living related liver transplantation in children. *Am. J. Surg.* **168**: 41-48, 1994.
  47. Hashida, T., Masuda, S., Uemoto, S., Saito, H., Tanaka, K. and Inui, K. Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of

- living-donor liver transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**: 308-316, 2001.
48. Fukatsu, S., Yano, I., Igarashi, T., Hashida, T., Takayanagi, K., Saito, H., Uemoto, S., Kiuchi, T., Tanaka, K. and Inui, K. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**: 479-484, 2001.
  49. Trautwein, C., Rakemann, T., Obermayer-Straub, P., Niehof, M. and Manns, M.P. Differences in the regulation of cytochrome P450 family members during liver regeneration. *J. Hepatol.* **26**: 48-54, 1997.
  50. Ishizuka, M., Yoshino, S., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Imaoka, S., Funae, Y., Masuda, M., Iwata, H., Kazusaka, A. and Fujita, S. Isozyme selective alterations of the expression of cytochrome P450 during regeneration of male rat liver following partial hepatectomy. *Xenobiotica* **27**: 923-931, 1997.
  51. Favre, C., Monti, J.A., Scapini, C., Pellegrino, J., Carnovale, C.E. and Carrillo, M.C. Putrescine decreases cytochrome P450 3A4 levels during liver regeneration in the rat. *J. Hepatol.* **28**: 700-708, 1998.
  52. Hsieh, K., Lin, Y., Cheng, C., Lai, M., Lin, M., Siest, J. and Huang, J. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug. Metab. Dispos.* **29**: 268-273, 2001.
  53. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., Watkins, P.B., Daly, A., Wrighton, S.A., Hall, S.D., Maurel, P., Relling, M., Brimer, C., Yasuda, K., Venkataramanan, R., Strom, S., Thummel, K., Boguski, M.S. and Schuetz, E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **27**: 383-391, 2001.
  54. Westlind, A., Malmebo, S., Johansson, I., Otter, C., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M. and Oscarson, M. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome P450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**: 1349-1355, 2001.
  55. Domanski, T.L., Finta, C., Halpert, J.R. and Zaphiropoulos, P.G. cDNA cloning and

- initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.* **59**: 386-392, 2001.
56. Grenier, F.C., Luczkiw, J., Bergmann, M., Lunetta, S., Morrison, M., Blonski, D., Shoemaker, K. and Kobayashi, M. A whole blood FK 506 assay for the IMx<sup>®</sup> analyzer. *Transplant. Proc.* **23**: 2748-2749, 1991.
  57. Okabe, H., Hashimoto, Y. and Inui, K. Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**: 1467-1472, 2000.
  58. Fukuda, K., Ohta, T. and Yamazoe, Y. Grapefruit component interacting with rat and human P450 CYP3A: possible involvement of non-flavonoid components in drug interaction. *Biol. Pharm. Bull.* **20**: 560-564, 1997.
  59. Beal, S.L. and Sheiner, L.B. *NONMEM Users Guide*, University of California, San Francisco, 1992.
  60. Wilson, T.H. and Wiseman, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.* **123**: 116-125, 1954.
  61. Sugiura, M., Iwasaki, K., Noguchi, H. and Kato, R. Evidence for the involvement of cytochrome P-450 in tiaramide N-oxide reduction. *Life Sci.* **15**: 1433-1442, 1974.
  62. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254, 1976.
  63. Wang, R.W., Newton, D.J., Scheri, T.D. and Lu, A.Y. Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6  $\beta$ -hydroxylation and erythromycin N-demethylation. Competition during catalysis. *Drug Metab. Dispos.* **25**: 502-507, 1997.
  64. Hines, O.J., Bilchik, A.J., Zinner, M.J., Skotzko, M.J., Moser, A.J., McFadden, D.W. and Ashley, S.W. Adaptation of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter following intestinal resection. *J. Surg. Res.* **57**: 22-27, 1994.
  65. Kato, Y., Yu, D. and Schwartz, M.Z. Hepatocyte growth factor up-regulates SGLT1 and

- GLUT5 gene expression after massive small bowel resection. *J. Pediatr. Surg.* **33**: 13-15, 1998.
66. Masuda, S., Saito, H., Nonoguchi, H., Tomita, K. and Inui, K. mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules. *FEBS Lett.* **407**: 127-131, 1997.
  67. Vos, T.A., Hooiveld, G.J., Koning, H., Childs, S., Meijer, D.K., Moshage, H., Jansen, P.L. and Müller, M. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* **28**: 1637-1644, 1998.
  68. Vos, T.A., Ros, J.E., Havinga, R., Moshage, H., Kuipers, F., Jansen, P.L. and Müller M. Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology* **29**: 1833-1839, 1999.
  69. Higgins, G.M., Anderson, R.M. Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**: 186-202, 1931.
  70. Uemoto, S., Tanaka, K., Asonuma, K., Kitakado, Y., Katayama, T., Tanaka, M., Inomata, Y. and Ozawa, K. Effects of cyclosporine on oxidative phosphorylation and adenylate energy charge of regenerating rat liver. *Transplant. Proc.* **21**: 924-925, 1989.
  71. Maza, A., Gasceón, A.R., Calvo, M.B., Hernández, R.M. and Pedraz, J.L. Influence of partial hepatectomy on theophylline pharmacokinetics in rats. *J. Pharm. Sci.* **85**: 1133-1135, 1996.